Transport von 3-0-Methylglucose in isolierte Kardiozyten adulter Ratten: Charakterisierung des Transportsystems und Einfluß von Insulin

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Georgios Pandalis
aus Plana (Griechenland)

Düsseldorf 1983

UNIV. LEIDEN BIBL.

TRANSPORT VON 3-O-METHYLGLUCOSE IN ISOLIERTE KARDIOZYTEN ADULTER RATTEN: CHARAKTERISIERUNG DES TRANSPORTSYSTEMS UND EINFLUSS VON INSULIN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaflichen Fakultät

der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Georgios Pandalis

aus Plana (Griechenland)

Düsseldorf 1983

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Reinauer

2. Berichterstatter: Professor Dr. K.-D. Spindler

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juli 1983

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	4
2.1 Isolierung der Kardiozyten	4
2.2 Vitalitätsbestimmung	5
2.3 Transport-Messung	7
2.4 Bestimmung des "cell-space"	8
2.5 Material	9
2.5.1 Lösungen	9
2.5.2 Versuchsobjekt	10
2.5.3 Chemikalien	11
2.5.4 Geräte	12
2.6 Statistische Auswertung der Ergebnisse	12
3. Ergebnisse	13
3.1 Charakterisierung der Zellpräparation	13
3.1.1 Morphologie	13
3.1.2 Biochemie	18
3.1.3 Cell-Space	22
3.2 Verläßlichkeit der Meßtechnik	22
3.3 Charakterisierung des 3-O-Methylglucose-Transportsystems	26
3.3.1 Zeitlicher Verlauf des Transports	27
3.3.2 Bestimmung der Transportparameter K_t^{zt}, V_{max}^{zt}	27
3.3.3 Gegentransport	31
3.3.4 Hemmbarkeit des Transportsystems	33
3.3.5 Temperatur-Abhängigkeit	36
3.4 Einfluß von Insulin auf den 3-O-Methyl-glucose-Transport	38
3.5 Einfluß von Ca^{++}- und Mg^{++}-Ionen auf den Transport von 3-O-Methylglucose	44
4. Diskussion	49
4.1 Zellpräparation	49

Seite

4.2 3-O-Methylglucose-Transportsystem 50

4.3 Einfluß von Insulin, Ca^{++} und Mg^{++} auf den 3-O-Methylglucose-Transport 53

5. Zusammenfassung 57

6. Literatur 59

M E I N E R F R A U

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543909_0066

1. Einleitung

Glucose dient neben Fettsäuren und Ketonkörpern als physiologisches Substrat des Herzmuskels. Ihr Durchtritt durch die Cytoplasmamembran unterliegt einer hormonellen Regulation, was bei den anderen oben genannten Substraten nicht der Fall ist (Opie et al., 1979).
Viele Stoffwechselerkrankungen sind auf eine Fehlregulation des Glucosetransports bzw. -stoffwechsels zurückzuführen.
Beim akuten Diabetes entwickelt sich eine Insulinresistenz, wobei der Glucosetransport und -stoffwechsel gehemmt werden. Letzteres ist als Folge eines erhöhten Fettsäure- und Ketonkörperabbaus anzusehen (Oliver, 1972; Opie et al., 1979). So werden die Glucose-Phosphorylierung und der glykolytische Flux durch Hemmung der Phosphofructokinase- und Pyruvat-Dehydrogenase-Reaktion herabgesetzt (Morgan et al., 1961). Dieser Effekt resultiert wiederum aus einer Erhöhung der Citrat-Konzentration (Citrat ist ein Inhibitor der Phosphofructokinase), die durch den verstärkten Fettsäuremetabolismus hervorgerufen wird (Newsholme et al., 1964).
Dem Glucosestoffwechsel geht der Glucosetransport voraus (beim akuten Diabetes ebenfalls gehemmt), der ein begrenzender Faktor der Stoffwechselrate ist (Fischer, 1971). Er erfolgt am Muskelgewebe durch ein Träger-vermitteltes Transportsystem, das Sättigungskinetik, Stereospezifität, kompetitive Hemmung und Gegentransport aufweist (Regen et al., 1964).
Die Glucoseaufnahme in den Herzmuskel und ihre Regulation durch Insulin sind am perfundierten Ratten-Herzen intensiv studiert worden (Bodo et al., 1927; Chenoreth et al., 1946; Anderson et al., 1948; Opie et al., 1962; Morgan et al., 1964). Methoden, die auf Studien am gan-

zen Organ basieren, haben zwar den Vorteil, daß die Versorgung der Zellen während des Versuchs über das natürliche Zirkulationssystem erfolgt, sie bieten aber auch den Nachteil, daß aufgrund von Kapillardiffusionsbarrieren und Heterogenität des Systems keine exakten Daten über die Initialkinetik, die Lokalisation des Transportsystems und seine Modulation durch Insulin auf molekularer und zellulärer Ebene gewonnen werden können. Solche Studien erfordern den Einsatz eines homogenen Zellsystems, das frei von hormonellen und neuralen Einflüssen ist. Als solches haben sich die frisch isolierten Myozyten adulter Ratten als ein hervorragendes Modell erwiesen (Eckel und Reinauer, 1980; Dow et al., 1981; Eckel und Reinauer, 1982).

Die Isolierung dieser Zellen begann, seitdem man weiß, daß das Herz kein Synzytium darstellt (van Breemen, 1953; Muir, 1957), sondern im Gegensatz zum Skelettmuskel aus zelligen Elementen gebildet wird. Dazu entwickelte man verschiedene Isolationsmethoden, z.B. mechanische Trennung (Yokoyama, 1961; Tsokos, 1976), oder enzymatische Trennung (Berry et al., 1961; Kono, 1969; Vahouny et al., 1970). Die in dieser Arbeit angewandte Methode basierte auf einer enzymatischen Behandlung des Herzens mit Collagenase und Hyaluronidase während einer retrogarde-Perfusion und lieferte morphologisch und physiologisch intakte Zellen, die gegenüber physiologischen Ca^{++}-Konzentrationen tolerant sind und eine Ansprechbarkeit auf Insulin zeigen (Eckel et al., 1982).

Die Insulin-Wirkung auf das Glucosetransportsystem verschiedener Zellsysteme ist seit langer Zeit Gegenstand kontroverser Meinungen. Man beobachtete eine Stimulierung des Transports, die entweder auf eine Veränderung der maximalen Transport-Geschwindigkeit (Narahara et al., 1963; Czech, 1980) oder einer Veränderung der Halbsättigungskonstante (Illiano et al., 1971; Crofford, 1975) beruht.

Über den Insulin-Wirkungsmechanismus, der diesen Veränderungen zugrunde liegt, sind mehrere Hypothesen aufgestellt worden (für Übersichtsartikel siehe Czech, 1980; Denton, 1981). Am intensivsten wird zur Zeit über eine Translokation von intrazellulären Transporteinheiten (Wardzala et al., 1981) bzw. über die Existenz eines "second messengers" in Form von Ionen (Bihler, 1972) diskutiert.
Ziel der vorliegenden Arbeit war 1) detailierte Studien zur Initialkinetik des Glucose-Transportsystems Ca^{++}-toleranter Myozyten adulter Ratten zu erstellen, 2) die Modulation des Glucose-Transportsystems durch Insulin zu testen, 3) den zeitlichen Wirkungseintritt von Insulin zu erfassen und 4) experimentelle Ansätze zur Klärung des komplexen Signaltransfers vom Insulin-Rezeptor zum Glucose-Transportsystem unter besonderer Berücksichtigung der ionischen Wirkung von Calcium und Magnesium zu entwickeln.

2. Material und Methoden

2.1 Isolierung der Kardiozyten

Die Isolierung der Kardiozyten, basierend auf einer Methode von Scheuer und Berry (1967), begann morgens mit der Applikation der Narkose (siehe nachfolgendes Schema), die nach kurzem Ätherrausch mit 25 %iger Urethanlösung i.p. erfolgte (0,4 ml bis maximal 0,6 ml pro 100 g Körpergewicht). Gegen die Blutgerinnung bekam das Tier unmittelbar danach eine Injektion von 250 E Liquemin in die V. femoralis. Wegen Ausfalls der eigenen Atmung wurde das Tier nach Tracheotomie an eine Beatmungspumpe angeschlossen (Atemfrequenz 44/min; Inspirationsdruck 150 mMWs). Anschließend wurde das Herz durch vorsichtige Öffnung der Thoraxwand, Durchschneiden des Diaphragmas und Abtrennen des Thymus freipräpariert. Folgende Ligaturfäden wurden locker vorgelegt, um eine retrogarde-Perfusion (Scheuer et al., 1967) zu ermöglichen:

Ligatur 1: um die V. cava ant. dex., A. subclavia dex., A. carotis dex.

Ligatur 2: um die A. carotis sin., V. cava ant. sin., A. subclavia sin.

Nun wurde die Aorta in Höhe des Diaphragmas angeschnitten und die Teflonkanüle - durch die Kanüle fließen hintereinander die vortemperierten (40° C) Perfusionslösungen 1 und 2 (s.u.) - eingeführt und bis unterhalb des Aortenbogens vorgeschoben. Nach Fixierung der Kanüle begann in zeitlicher Reihenfolge der Durchlauf der Perfusionslösung 1 in das Herz, der Anschnitt der A. pulmonalis und das Knüpfen der vorbereiteten Ligaturen. Der Durchlauf der Perfusionslösung 1, sprich Vorperfusion, der dem Entfernen des extrazellulären Calciums

und des Blutes aus dem Kardialraum dient, dauerte 2 - 3 Minuten und verlief mit einer Geschwindigkeit von 40 Tropfen/Minute. Es folgte der Durchlauf der Perfusionslösung 2 mit der gleichen Geschwindigkeit. Dieser Präparationsschritt war eine enzymatische Behandlung mit Collagenase (0,04 %) und Hyaluronidase (0,15 %) und lieferte uns nach ca. 40 minütiger Perfusion ein "weiches" Herz, das nun aus dem Körper entnommen, mit Hilfe zweier Pinzetten zerkleinert und in der gleichen Lösung 10 Minuten bei 37° C nachdissoziiert wurde. Durch anschließendes Filtrieren der Zellsuspension durch ein Plastiksieb (Porengröße 700 µ) bei Zimmertemperatur und Zentrifugieren des Filtrats bei 50 x g in Inkubationslösung 3 (s.u.) erhielten wir noch nicht vollständig dissoziierte Zellen, die erst durch eine 30 minütige Trypsin-Nachbehandlung (Rotieren der Zellsuspension in Trypsin (0,1 %) in Inkubationslösung 3 bei 37° C) dissoziierten. Der Trypsinisierungsstop erfolgte durch Zugabe von Trypsin-Inhibitor (0,2 %). Die Collagenase-, Hyaluronidase-, Trypsin- und Trypsin-Inhibitor-Reste sowie Zellfragmente wurden durch Abzentrifugieren der Zellen bei 50 x g und wiederholtes Resuspendieren in frischem Inkubationsmedium entfernt. Anschließend (gegen 13°° Uhr) wurden Zellzahl und Vitalität bestimmt.

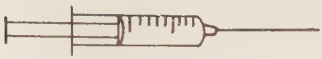
2.2 Vitalitätsbestimmung

A) Lichtmikroskopisch: Stäbchenförmige, eckige Kardiozyten wurden in Anlehnung an die Literatur (Berry et al., 1970) als vital und abgerundete bzw. "blebs"-bildende Zellen (Rajs et al., 1980) als nicht vital bezeichnet.
B) ATP-Messung: Als zusätzliches Vitalitätskriterium wurde der ATP-Gehalt der Zellen routinemäßig bestimmt. Die Bestimmung erfolgte luminometrisch nach dem Luciferin-

Zellisolierung

9^{00} Uhr

kurzer Ätherrausch
(ca. 2 min)



Urethan-Injektion

künstliche Beatmung

Freilegen des Herzens

Ligaturen

Nachdissoziation

95% O_2
5% CO_2

Filtrieren

Perfusion

Zentrifugieren
50 x g, ca. 3 min

stark aggregierende Zellen

13^{00} Uhr

Trypsin
30 min

Vitalitätsbestimmung

isolierte Kardiozyten

Luciferiferase-Testprinzip:

Luciferin (LH_2) + Luciferase (E) + Mg/ATP $\rightleftharpoons$ E-LH_2-AMP + PP

E-LH_2-AMP + O_2 $\longrightarrow$ E-Produkt-Komplex + CO_2

E-Produkt-Komplex $\longrightarrow$ E + Oxyluciferin + AMP + Licht ($\overline{490 - 630}$ nm)

Vorbereitung: Für die Extraktion wurden 25 µl der Zellsuspension (≙ 10^4 Zellen) mit 175 µl TCA (10 %) gemischt und 5 Minuten bei 0° C inkubiert. Es folgte eine Verdünnung des Extraktes mit Tris-EDTA (50 µl Extrakt + 5 ml Tris-EDTA). 800 µl dieser Verdünnung wurden mit 200 µl ATP-Reagens in einer Meßküvette gemischt und gegen einen ATP-Standard im Luminometer gemessen.

2.3 Transport-Messung

Nach Isolierung und Vitalitätsbestimmung der Kardiozyten wurde die Glucose durch mehrmaliges Sedimentieren der Zellen und jeweils anschließendes Resuspendieren in Glucose-freiem Inkubationsmedium 3 weitgehend entfernt (Glucoseendkonzentration $< 10^{-6}$ Mol/l). In diesem Medium und bei einer Zellkonzentration von 4 x 10^5 Zellen pro ml wurden die Zellen 30 Minuten bei der entsprechenden Temperatur vorinkubiert. Um eine optimale Oxygenierung während der Inkubation zu gewährleisten wurden sie in Polystyrol-Röhrchen mit einer Frequenz von 50 Schüttelbewegungen pro Minute geschüttelt (Zellsuspensionsvolumen: 0,5 ml pro Röhrchen).
Nach der oben beschriebenen Vorinkubation begann die Messung des Methylglucose-Transports (Dreifachmessung). Bei t = 0 wurden 50 µl Inkubationslösung 3 in 50 µl vortemperierte 3-O-[^{14}C]Methylglucose (spezifische Aktivität 57,2 mCi/mMol - außer bei Temperatur- und Konzentrationsabhängigkeit des Transports, wo die spezifische Aktivität variierte; radioaktive Konzentration 11,76 µCi/ml) einpipettiert und weiter geschüttelt.

Der Transport-Stop erfolgte nach definierten Zeiten (die mit Hilfe eines quarzgesteuerten Metronoms exakt eingehalten wurden) durch rapides Einschießen von 0,9 ml eiskalter Cytochalasin B-Lösung (38 µMol/l) in das Inkubationsröhrchen. Ein Aliquot von 0,6 ml wurde in 2 Polyäthylen-Tubes (Microtubes; Volumen 0,3 ml), die 100 ul Silikonöl (Dichte 1,06) enthielten, überführt und anschließend 30 Sekunden bei 10 000 x g zentrifugiert. Danach wurden die Spitzen ca. 2 mm über dem Zellpellet abgeschnitten und in 1 ml TS_1 (s.u.) über Nacht zum Solubilisieren stehengelassen. Zur schnellen Abnahme der Chemolumineszens gaben wir jeweils 100 ul Essigsäure (100 % V/V) in die Szintillationsröhrchen (Minivials). Nach Zugabe von 5 ml Szintillationscocktail (s.u.) wurde die relative Radioaktivität anhand eines gleichquenchenden Standards gemessen.
Als Korrektur für unspezifische Aufnahme (= Diffusion + extrazellulärer space) diente unter gleichen Bedingungen die Aufnahme von L-^{14}C-Glucose (spezifische Aktivität 58 mCi/mMol - außer bei Konzentrationsabhängigkeit der L-Glucose-Aufnahme; radioaktive Konzentration 11,76 µCi/ml). Experimentell verlief sie als Duplikatmessung wie die oben beschriebene Transport-Messung von Methylglucose.

2.4 Bestimmung des cell-space (^3H_2O-space)

Zur Bestimmung des intrazellulären Volumens der Kardiozyten (cell-space) wurden 1) die Aufnahme von ^3H_2O bis zum Äquilibrium und 2) die Aufnahme von (Hydroxy ^{14}C-Methyl)Inulin ebenfalls bis zum Äquilibrium gemessen. Die Differenz zwischen ^3H_2O-space (= Gesamtvolumen) und (Hydroxy ^{14}C-Methyl)Inulin-space (= extrazelluläres Volumen, da Inulin die Zellmembranen nicht passieren kann) ergibt den cell-space.
Die ^3H_2O- und (Hydroxy ^{14}C-Methyl)Inulin-Aufnahme verlie-

fen experimentell wie die Messung des Transports von 3-O-Methylglucose (s.o.), wobei die Inkubationszeit 10 Minuten betrug. Das Stoppen der $^{3}H_2O$-Aufnahme und der (Hydroxy-^{14}C-Methyl)Inulin-Aufnahme erfolgte analog zum Methylglucose-Transport.

2.5 Material

2.5.1 Lösungen

Perfusionslösung 1

(KREBS-RINGER-Bicarbonat-Puffer), pH 7,4

Zusammensetzung: (mMol/l)		
	NaCl	135
	KCl	4,75
	KH_2PO_4	1,19
	Na_2HPO_4	16
	$NaHCO_3$	25
	Saccharose	134
	HEPES	10
	Glukose	10

Dieser Puffer war mit 95 % O_2 und 5 % CO_2 bei 40° C äquilibriert und annähernd Ca-frei (J. Eckel, persönliche Mitteilung); seine Osmolarität betrug ca. 310 mOsm/kg.

Perfusionslösung 2

pH 7,4

Sie unterschied sich von Perfusionslösung 1 durch den Zusatz von:

0,5 %	Albumin (gereinigt)
0,04 %	Collagenase
0,15 %	Hyaluronidase

Vor der Perfusion wurde diese Lösung filtriert (Millipore-Filter; 5 u).

(Inkubations)lösung 3

(modifizierter KREBS-RINGER-HEPES-Puffer), pH 7,4

Zusammensetzung:	NaCl	130	
(mM)	KCl	4,8	
	KH_2PO_4	25	
	Albumin (Fraktion V)	2	%
	(Glukose	5	)

Durch 20minütiges Begasen mit O_2 wurde der Puffer bei Zimmertemperatur äquilibriert; seine Osmolarität betrug ca. 310 mOsm/kg.

Bemerkungen:
- Albumin wurde erst nach dem Begasen zugegeben
- Der Glukose-freie Puffer war für die Transport-Messung bestimmt

2.5.2 Versuchsobjekt

männliche Wistar-Ratten
Körpergewicht 200 - 270 g
Ernährung mit handelsüblichem Futter
die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Nahrung

2.5.3 Chemikalien

3-O-[^{14}C]Methyl-D-Glukose (spez. Akt. 57,2 mCi/mMol)	Amersham, Braunschweig
L-[^{14}C]Glukose (spez. Akt. 58 mCi/mMol)	" "
$^{3}H_2O$ (spez. Akt. 5 mCi/g)	" "
(Hydroxy-^{14}C-Methyl)Inulin (spez. Akt. 8,5 mCi/mMol)	" "
Schweine-Insulin (monocomponent)	Novo, Bagsvaerd, Dänemark
Rinder-Serum-Albumin (hochgereinigt bzw. Frakt. V)	Behringwerke, Marburg bzw. Miles, Frankfurt
Collagenase (EC 3.4.24.3)	Boehringer, Mannheim
Hyaluronidase (EC 3.2.1.35)	Sigma, München
Cytochalasin B	" "
2,4-DNP	" "
Trypsin (EC 3.4.21.4)	Worthington, Freehold, U.S.A.
Trypsin-Inhibitor	" "
TS-1	Zinsser, Frankfurt
Quickszint 212	" "
ATP-monitoring-kit	LKB, Gräfelfing
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure)	Serva, Heidelberg
EDTA	Sigma, München
EGTA	" "
Ionophor A 23187	Boehringer, Mannheim
Silikonöl (Dichte: 1,06 g/ml)	Wacker Chemie, München
3-O-Methylglukose	Sigma, München

Alle anderen Substanzen waren p.A.-Qualität und wurden von Merck, Darmstadt, Serva, Heidelberg oder Sigma, München bezogen.

2.5.4 Geräte

Flüssigszintillationszähler Berthold, BF Betaszint

Microfuge B, Beckman instruments, München

Beatmungspumpe, B. Braun Melsungen, Typ 8740 (nach Schuler)

Luminometer, LKB Typ 1250

2.6 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Bei allen Werten handelt es sich um Mittelwerte von mindestens drei Triplikat-Messwerten, wobei der mittlere Fehler des Mittelwertes (SEM) angegeben ist. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe des "Student's-t-tests" ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Zellpräparation

3.1.1 M o r p h o l o g i e

Das zu untersuchende Material, die frisch isolierten Myozyten adulter Ratten, macht zahlenmäßig weniger als 25 % des gesamten Herzmuskels aus (Zak, 1974). Diese Zellen haben eine nicht-regelmäßige Stäbchenform (s. Abb. 1) mit einer Breite von ca. 20 u und einer Länge von ca. 100 u. Allerdings ist das Verhältnis Länge/Breite der Myozyten nicht nur vom Zelldifferenzierungs- und Arbeitszustand, sondern auch von den Inkubationsbedingungen abhängig. Eine wichtige Rolle soll dabei die Oxygenierung spielen. Durch 90 minütige Inkubation in Gegenwart von O_2 konnte eine Zunahme der Breite mit gleichzeitiger Verkürzung der Zelle beobachtet werden (Rajs et al., 1980). Durch unsere enzymatische Behandlung wurden die Zellen transversal an den "intercalated disks" und lateral entlang der Glykokalyx isoliert, wobei letztere, im Gegensatz zu anderen Isolierungsmethoden (Vahouny et al., 1970), größtenteils erhalten blieb.
Die "intercalated disks" sind spezialisierte Kontaktregionen querbenachbarter Myozyten. Diese Regionen bestehen aus zwei Cytoplasmamembranen, die ineinandergreifende Ein- und Ausstülpungen aufweisen (s. Abb. 2). Sie sind kontinuierliche Fortsetzungen der Cytoplasmamembranen der angrenzenden Zellen und bilden die Grundlage für die Leitung der elektrischen Impulse durch das Myokardium (Dow et al., 1981). Diese multilaminare Struktur erlaubt die Trennung der angrenzenden Zellen voneinander, ohne daß sie ihre funktionelle Integrität verlieren.
Die Glykokalyx ist eine Glykoproteid-Schicht, die die

Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer isolierten Myozyte

A) in der Übersicht (1800-fach)
B) im Anschnitt (19200-fach)

N Kern, Np Kernporen, Z Z-Linie, ER Endoplasmatisches Retikulum, tT transversale Tubuli, CM Cytoplasmamembran, Gk Glykokalyx, i.d. "intercalated disks"

EM: F. Kopp

Zellmembranen benachbarter Zellen miteinander verkittet (Mc Nutt et al., 1970) und an der Regulation des Ca-Flusses beteiligt ist (Frank et al., 1976). Sie ist gegenüber Hyaluronidase empfindlich und benötigt für ihren Zusammenhalt Ca^{++}-Ionen in einer Konzentration von 50 - 250 µM (Crevey et al., 1978).
Mitochondrien, Zellkerne (meistens 2 pro Zelle), Sarkoplasmatisches Retikulum, der kontraktile Apparat mit regelmäßig angeordneten Myofilamenten - gut zu erkennen sind dabei die Z-Linien, A- und I-Banden - und die Plasmamembran mit den Transversaltubuli (tubuläre Invaginationen der Plasmamembran in das Sarkoplasma in Nähe der Z-Linien; eine wichtige Komponente in dem Prozeß der Anhäufung von Ca im Cytosol nach der Zell-Depolarisation) zeigten eine normale Struktur und deuteten auf eine intakt erhaltene Zellkompartimentierung hin.
Lichtmikroskopisch schwer zu erkennen, aber elektronenmikroskopisch deutlich sichtbar, ist sporadisch die Existenz von Endothelzellen festzustellen, die meistens in enger Assoziation mit den Myozyten erhalten sind. Reizleitungs- und Bindegewebszellen sind bei keiner Präparation beobachtet worden. Vermutlich hielten sie die enzymatische Behandlung aufgrund ihrer besonderen Empfindlichkeit nicht aus.
Die im Methodenteil beschriebene Isolierungstechnik lieferte uns also Zellpopulationen, die fast ausschließlich aus Myozyten bestanden und eine Vitalität von 80 - 100 % aufwiesen.

Gegenüber physiologischen Konzentrationen von extrazellulären Ca^{++}-Ionen waren die stäbchenförmigen Myozyten tolerant (s. Abb. 3) (nur während der Perfusion zeigten sie eine hohe Empfindlichkeit gegenüber solchen Ca^{++}-Konzentrationen, bekannt als Ca^{++}-Paradoxon (Zimmerman et al., 1966)). Ca^{++}-nicht-tolerante Zellen zeigen in Gegenwart physiologischer Ca^{++}-Konzentrationen irrever-

sible Kontraktionen und runden ab. Diese Zellen vermögen nicht den Ca^{++}-Influx zu regulieren; die intrazelluläre Ca^{++}-Konzentration übersteigt die normalen mikromolaren Werte, und dadurch wird der Relaxationsprozeß, der durch das Abdissoziieren von Ca^{++}-Ionen von Troponin eingeleitet wird, gehemmt.
Ca^{++}-tolerante Myozyten konnten nicht isoliert werden, wenn während der Perfusion ein Serum-Albumin zugegeben wurde, das mehr Calcium enthielt, als das von uns normalerweise verwandte hochgereinigte Albumin. Die so isolierten nicht Ca^{++}-toleranten Myozyten wiesen ganz andere Glukose-Transport-Eigenschaften auf (s. Tab. 4).

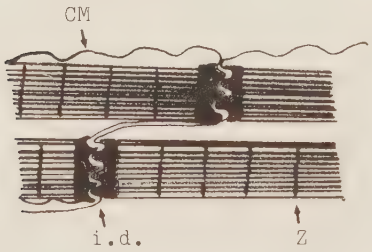


Abb. 2: Schema der "intercalated disk"-Regionen zweier benachbarter Myozyten

CM Cytoplasmamembran, Z Z-Linie, i.d. "intercalated disk"
verändert nach Muir (1957)

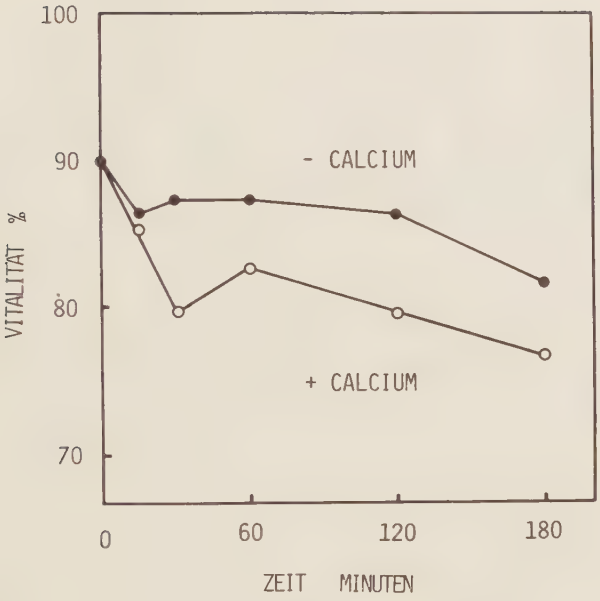


Abb. 3: Einfluß von Calcium auf die Vitalität der Myozyten

Frisch isolierte Myozyten (4 x 10^5 Zellen/ml) wurden in Inkubationslösung 3 bei 37° C mit (o–o) und ohne (•–•) Calcium (2,5 mMol/l) inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurde ein Aliquot (25 ul) von der Zellsuspension für die optische Vitalitätsbestimmung entnommen. Die Werte sind Mittelwerte von 3 Experimenten.

3.1.2 Biochemie.

Die isolierten Zellen hatten einen durchschnittlichen ATP-Gehalt von 192 nMol/10^6 Zellen (s. Tab. 1). Dieser ATP-Gehalt blieb bei 37° C in Gegenwart von D-Glucose (5 mMol/l) nach einer anfänglichen Zunahme über mehrere Stunden Inkubationszeit konstant (s. Abb. 4).
Aufgrund der Bedeutung des ATPs für die Insulin-Signalübertragung wurde der ATP-Gehalt der Myozyten unter verschiedenen Bedingungen gemessen (s. Tab. 1). Lactat und Pyruvat (jeweils 5 mMol/l) konnten in bezug auf den ATP-Gehalt und die Vitalität die Glucose ersetzen. 2,4-DNP (1 mMol/l), ein Entkoppler der oxydativen Phosphorylierung, bewirkte erwartungsgemäß eine Reduzierung des ATP-Gehaltes von 50 %, ohne Einfluß auf die Vitalität. Eine geringe Abnahme konnte man in Abwesenheit jeglichen Substrats beobachten.
Eine 3 stündige Inkubation mit $CaCl_2$ (2,5 mMol/l) bei 37° C bewirkte, im Gegensatz zu früheren Arbeiten (Forrester et al., 1977), keine Reduzierung des ATP-Gehaltes, sondern in Übereinstimmung mit Montini et al. (1981) eher eine Erhöhung, was auf eine Ca^{++}-Toleranz hindeutet. Ohne Einfluß auf den ATP-Gehalt blieb $MgSO_4$ (1,2 mMol/l), auch bei längerer Inkubationszeit.
Der Ionophor A 23187 (20 µMol/l) - bildet mit zweiwertigen Kationen stabile Komplexe und erhöht die Permeabilität biologischer Membranen für diese Ionen (Pressman, 1976) - bewirkte lediglich bis zu einer Inkubationszeit von 30 Minuten keine Veränderung des ATP-Gehaltes. Erst bei längeren Inkubationszeiten beobachtete man eine signifikante ATP-Abnahme.
EDTA (1 mMol/l) und EGTA (1 mMol/l) übten auch bei längerer Inkubationszeit (bis zu 2 Stunden) keinen Einfluß aus. Auch Insulin ($2,7 \times 10^{-7}$ Mol/l) bewirkte keine Änderung des ATP-Gehaltes.

Tab. 1: ATP-Gehalt der Myozyten bei verschiedenen Inkubations-Bedingungen

Die Myozyten (4×10^5 Zellen/ml) wurden in Inkubationslösung 3 unter Zusatz der unten angegebenen Substanzen bei 37° C inkubiert. Nach den angegebenen Inkubationszeiten wurde ein Aliquot von 25 µl Zellsuspension für die ATP-Bestimmung entnommen. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM aus der angegebenen Anzahl (n) der Versuche.

Behandlung (Mol/l)	Ink.-Zeit (Minuten)	ATP-Gehalt (nMol/10^6 Zellen)	n
Kontrolle	60	192 ± 9	28
"	120	171 ± 10	11
2,4-DNP (10^{-3})	60	93 ± 12 *	3
$MgSO_4$ ($1{,}2 \times 10^{-3}$)	60	185 ± 15	4
"	120	170 ± 18	3
Ionophor A 23187 (2×10^{-5})	30	181 ± 17	3
"	60	130 ± 12 *	3
Lactat (5×10^{-3})	60	187 ± 9	3
Pyruvat (5×10^{-3})	60	186 ± 15	3
EDTA (10^{-3})	120	165 ± 12	3
EGTA (10^{-3})	120	176 ± 18	3

* signifikant unterschiedlich von den entsprechenden Kontrollwerten mit $p < 0{,}05$

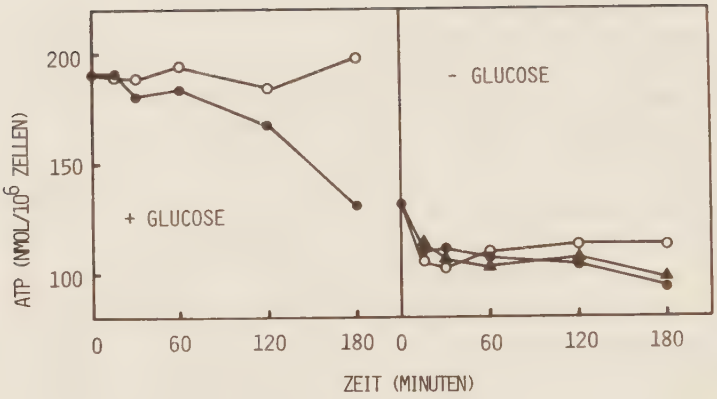


Abb. 4: Zeitlicher Verlauf des ATP-Gehaltes der Myozyten

Links: 4 x 10^5 Zellen/ml wurden in Inkubationslösung 3 mit (o—o) und ohne (●—●) Calcium (2,5 mMol/l) inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurde der ATP-Gehalt eines Aliquots (25 µl) der Zellsuspension bestimmt (n = 3).
Rechts: Die ATP-Bestimmung erfolgte unter gleichen Bedingungen wie oben, aber mit Glucose-freiem Inkubationsmedium. Die Zellen wurden in Abwesenheit (●—●) oder in Gegenwart (o—o) von Calcium oder Insulin (2 x 10^{-7} Mol/l) (▼—▼) inkubiert. Die Werte sind Mittelwerte von 3 Experimenten.

ADP- und AMP-Gehalt (24,1 und 6,8 nMol/10^6 Zellen) der Myozyten sind niedriger als der ATP-Gehalt, während der Kreatinphosphat-Gehalt in etwa die gleiche Größenordnung erreicht (219 nMol/10^6 Zellen) (Eckel und Reinauer, 1980). Der Kalium-Gehalt der Zellen - ein wichtiges Vitalitätskriterium - nimmt während 3 Stunden Inkubationszeit nur um etwa 15 % ab (Eckel und Reinauer, 1980), was mit der Abnahme der Vitalität übereinstimmt (s. Abb. 3).
Eine über 4 Stunden konstante Proteinsynthese und eine Glucoseoxydation von 1,05 µMol/10^6 Zellen x h (Eckel und Reinauer, 1980) sind Kriterien für einen auch nach der Isolierung ablaufenden Zellmetabolismus.

3.1.3 Cell-Space

Ein sehr wichtiges Merkmal einer Zellpräparation ist der cell-space, der auch als Vitalitätskriterium dienen könnte (tote Zellen haben ein anderes Zellvolumen als vitale). Viele Autoren beziehen ihre Daten genauigkeitshalber auf den jeweiligen cell-space der Präparation.
Der cell-space der Myozyten betrug 25 $\mu l/10^6$ Zellen $\pm$ 1,6 bei n = 3.
Dieser space wurde durch Insulin (250 nMol/l, 30 Minuten Vorinkubation bei 37° C) nicht signifikant verändert (26,51 $\mu l/10^6$ Zellen $\pm$ 2,5 bei n = 3).
Der intrazelluläre Raum, der der 3-O-Methylglucose zur Verfügung stand, betrug 13 $\mu l/10^6$ Zellen $\pm$ 0,7 bei n = 8 und wurde durch Insulin ebenfalls nicht signifikant verändert (13,9 $\mu l/10^6$ Zellen $\pm$ 0,9 bei n = 8).
Zur Bestimmung des Methylglucose-space wurden die spezifischen Äquilibriumsdaten beim Methylglucose-Transport (s. zeitlicher Verlauf des Transports) und die Konzentration der Methylglucose im Inkubationsmedium zur Hilfe genommen und daraus das aufgenommene Volumen der Methylglucose errechnet.
An den Daten ist zu erkennen, daß der Methylglucose nur die Hälfte des intrazellulären Raumes zur Verfügung stand.

3.2 Verläßlichkeit der Meßtechnik

Zur Messung des trägervermittelten 3-O-Methylglucose-Transports mußte zuerst ein Meßsystem entwickelt werden, das es uns erlaubte: 1) den Transportvorgang nach gewünschten Inkubationszeiten effektiv zu stoppen, 2) eine exakte Korrektur für die unspezifische Aufnahme des D-Glucose-Analogons anzugeben, wobei der spezifische Teil der Aufnahme, nämlich der trägervermittelte Transport, ermittelt werden kann und 3) die unspezifische Aufnahme so klein wie möglich zu halten.

Das rapide Stoppen des Transports ermöglichte eine 38 µM eisgekühlte Cytochalasin B-Lösung. Cytochalasin B, ein Pilz-Metabolit, der spezifisch den Glucosecarrier verschiedener eukaryontischer Zellen blockiert (Lin, 1974) und dadurch den Glucosetransport hemmt, wirkte auch hier effektiv. Unterstützt wurde dieser Stop-Vorgang auch durch die niedrige Temperatur und die Verdünnung der 3-O-Methylglucose durch die Stop-Lösung. So konnten Transportzeiten bis zu 5 Sekunden gemessen werden. Auch Efflux-Messungen (hier nicht präsentiert) bestätigten die Effektivität des Stop-Vorganges. Anschließend trennten wir die Zellen von der Stop-Lösung durch sofortige Ölzentrifugation (Klingenberg et al., 1967).
Die unspezifische Aufnahme (Extrazellularraum und Diffusion) wurden bei jedem Versuch mitgemessen und berücksichtigt. Dazu diente die Messung der Aufnahme von L-Glucose (s. Abb. 5), die auch bei sehr hohen L-Glucose-Konzentrationen keine Sättigung aufweist. Dies bedeutet, daß die L-Glucose-Aufnahme ausschließlich durch Diffusion erfolgt. Den größten Teil der unspezifischen Aufnahme machte aber der Extrazellularraum aus. Das läßt sich daran erkennen, daß die unspezifische Aufnahme von der Verdünnung beim Stop-Vorgang stark abhängig ist. Je nach Verdünnung wurde bei den niedrigsten Transportzeiten ein Verhältnis von unspezifischer zu spezifischer Aufnahme zwischen 30 und 80 % gemessen. Das 30 %-Verhältnis erreichten wir bei einer Verdünnung der 3-O-Methylglucose von 1 : 10 durch die Stop-Lösung.
Von Bedeutung für die unspezifische Aufnahme ist auch die Vitalität der Kardiozyten. Daher benutzten wir nur Präparationen vergleichbarer Vitalität (80 - 100 %).

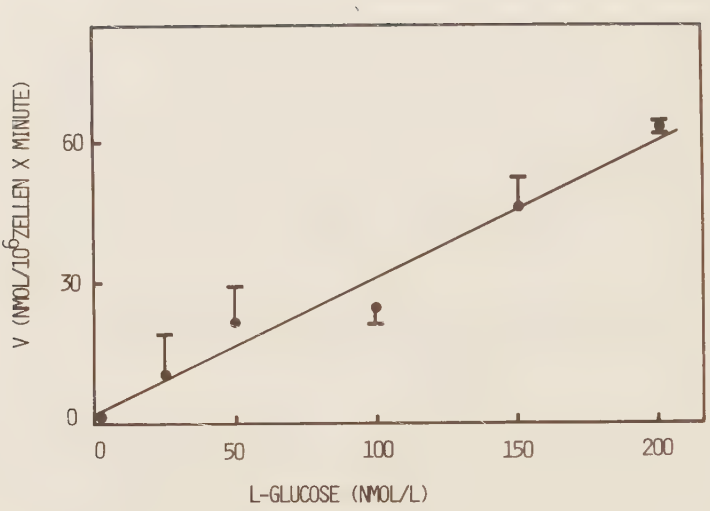


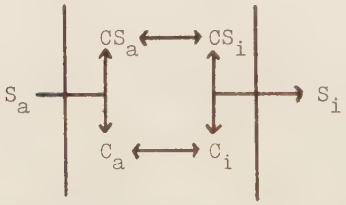
Abb. 5: Konzentrationsabhängigkeit der L-Glucose-Aufnahme

Die Myozyten (4 x 10^5 Zellen/ml) wurden 2 Stunden bei 25° C in Inkubationslösung 3, die unmarkierte L-Glucose in den angegebenen Konzentrationen enthielt, vorinkubiert. Anschließend inkubierte man für 20 Sekunden ein Aliquot (50 µl) der Zellsuspension in L-Glucose inklusiv Tracer (L- ^{14}C - Glucose; spez. Aktivität je nach Konzentration zwischen 5,6 und 0,028 mCi/mMol; Konzentration 100 µMol/l) gleicher L-Glucose-Konzentration, bei einer Zellkonzentration von 2 x 10^5 Zellen/ml. Die Quantifizierung und das Stoppen der Aufnahme erfolgte analog zum Methylglucose-Transport. Alle Daten sind mittels (Hydroxy-^{14}C-Methyl)Inulin (spez. Aktivität 0,043 mCi/mMol) um den extrazellulären space korrigiert (s. 2.4).

Dazu wurde die L-Glucose-Aufnahme unter gleichen Bedingungen wie oben beschrieben, aber mit dem Tracer (Hydroxy-^{14}C-Methyl)Inulin bestimmt.

3.3 Charakterisierung des 3-O-Methylglukose-Transportsystems

Die Charakterisierung des o.g. Transportsystems erfolgte hier bei "zero-trans"-Transport-Bedingungen, wobei der Influx der radioaktiv markierten 3-O-Methylglukose gemessen wurde. Die "zero-trans"-Flux-Bedingungen sind erfüllt, wenn die intrazelluläre Substratkonzentration zu Beginn der Transport-Messung gleich Null ist. Experimentell ist sie die einfachste Transport-Prozedur - im Gegensatz zu "equilibrium-exchange", "infinite-trans" und "infinite-cis" Prozeduren (Stein, 1981) - und theoretisch gut geeignet zur Bestimmung der Kinetik eines "simple carriers".
Das klassische Kinetik-Schema eines "simple carriers" sieht wie folgt aus:



außen (cis) Membran innen (trans)

C : Carrier
S : Substrat
CS : Carrier-Substrat-Komplex
a,i : extra- bzw. intrazelluläre Phase

Unabhängig vom Transportschritt gilt dabei folgende Gleichung:

$$K_s = \frac{c_a \; s_a}{cs_a} = \frac{c_i \; s_i}{cs_i}$$ (nach Höfer, 1974)

c, s und cs: Konzentrationen des Carriers (c), des Substrats (s) und des Carrier-Substrat-Komplexes (cs)
K_s: Dissoziationskonstante von CS

3.3.1 Zeitlicher Verlauf des Transports

Eine wichtige Voraussetzung für die Bestimmung der Transportparameter ist, daß unidirektionale Fluxe gemessen werden, d.h. beim Messen des Influxes muß $s_i = 0$ sein (s.o.). Das ist der Fall, wenn die Anfangsgeschwindigkeiten (Initialgeschwindigkeiten) v_o bestimmt werden, solange die Substratkonzentration auf der trans-Membranseite vernachlässigbar ist, d.h. solange diese von dem zunehmenden Efflux noch nicht beeinflußt wird.
Abb. 6 zeigt den zeitlichen Verlauf des 3-O-Methylglucose-Transports bei 25° C und 37° C. Die Initialgeschwindigkeiten betrugen 12,0 pMol/10^6 Zellen x Sekunde bzw. 25,2 pMol/10^6 Zellen x Sekunde. Die halbmaximalen Transportzeiten bis zum Äquilibrium betrugen 150 Sekunden bzw. 45 Sekunden bei initialen Influxphasen von 40 Sekunden bzw. 20 Sekunden.

3.3.2 Bestimmung der Transport-Parameter K_t^{zt}, V_{max}^{zt}

Die Halbsättigungskonstante (K_t^{zt}) eines Trägers entspricht der Substratkonzentration, bei der der Transport mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft.
Im Gegensatz aber zu der K_m der enzymatischen Reaktionen, die ein direktes Maß der Enzymaffinität zum Substrat ist, erlaubt K_t nur eine indirekte Aussage über die Trägeraffinität, denn sie wird nicht nur von der Dissoziationskonstante des Träger-Substrat-Komplexes bestimmt, sondern auch von der Geschwindigkeitskonstante jedes einzelnen Transportschrittes.
Die maximale Transportgeschwindigkeit V_{max}^{zt} ist ein Maß für die Kapazität des Transportsystems. Sie hängt ab:
1) von der Zahl der vorhandenen Trägermoleküle in der

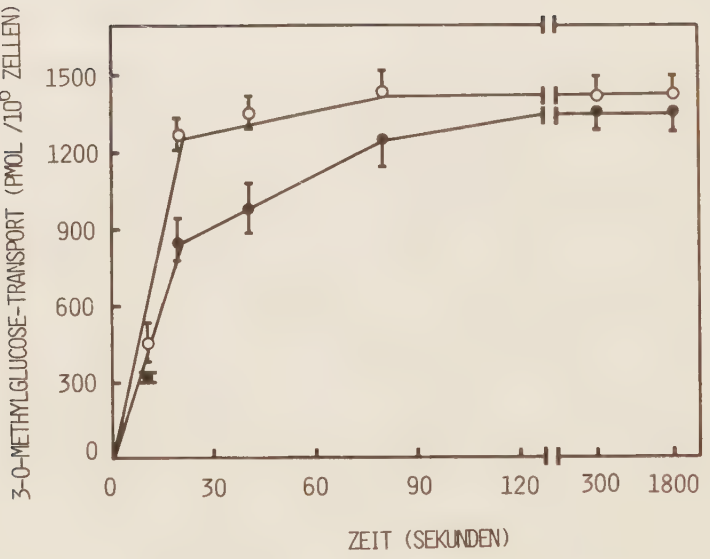


Abb. 6: Zeitlicher Verlauf des 3-O-Methylglucose-Transports bei 25° C (▼–▼) und 37° C (■–■)

Isolierte Myozyten wurden in Inkubationslösung 3 ohne Glucose 30 Minuten bei 25° C und 37° C vorinkubiert. Die Zellkonzentration betrug 4 x 10^5 Zellen/ml.
Anschließend wurden Aliquote (50 µl) der Zellsuspension mit 3-O-[^{14}C]Methylglucose (spez. Aktivität 57,2 mCi/mMol, Konzentration 50 µMol/l) für die angegebenen Zeiten inkubiert. Der Transport wurde gestoppt und quantifiziert, wie unter Methoden beschrieben ist. Alle Daten sind um die unspezifische Aufnahme durch L-[^{14}C]-Glucose korrigiert (spez. Aktivität 58 mCi/mMol, Konzentration 50 µMol/l). Die Werte sind Mittelwerte ± SEM von 3 - 5 verschiedenen Versuchen.
Das Inset stellt die Anfangsgeschwindigkeiten des Transports bei 25° C (▼ ▼) und 37° C (■ ■) dar.

membran und 2) von der Umlaufrate des Trägers durch die Membran (Höfer, 1977).

Die Gleichung $v^{zt}_{1;2} = \frac{s_1 \, V^{zt}_{max\ 1;2}}{K^{zt}_{t\ 1;2} + s_1}$,

1 = cis-Membranseite
2 = trans-Membranseite
s_1 = Substratkonzentration an der cis Membranseite
$v^{zt}_{1;2}$ = Transportgeschwindigkeit von der cis- zur trans-Seite

die die Form einer Michaelis-Menten-Gleichung hat, kann auch hier angewandt werden (Christensen, 1975) und gibt die experimentellen Bestimmungen der Transportgeschwindigkeit $v^{zt}_{1;2}$ bei verschiedenen Substratkonzentrationen an.
Die Konzentrationsabhängigkeit des 3-O-Methylglucose-Transportes in isolierte Kardiozyten wurde im Konzentrationsbereich von 0,1 mMol/l bis 10 mMol/l gemessen. Eine beginnende Sättigung wurde im Bereich von 5 mM beobachtet. Zur Bestimmung der Transportparameter wurde eine Linearisierung der Daten durch eine Umformung nach Hanes (1922) durchgeführt. Dabei gilt:

$$\frac{s}{v} = \frac{1}{V_{max}} s + \frac{K_t}{V_{max}}$$

(Diesem Diagramm s/v gegen s wird aus statistischen Gründen ein leichter Vorrang gegenüber der Lineweaver-Burk-Auftragung (Cornish-Bowden, 1976) gegeben)

Das zu untersuchende Transportsystem hatte eine K^{zt}_t von 6.8 mMol/l für 3-O-Methylglucose und eine V^{zt}_{max} von 160 nMol/10^6 Zellen x Minute (s. Abb. 7).

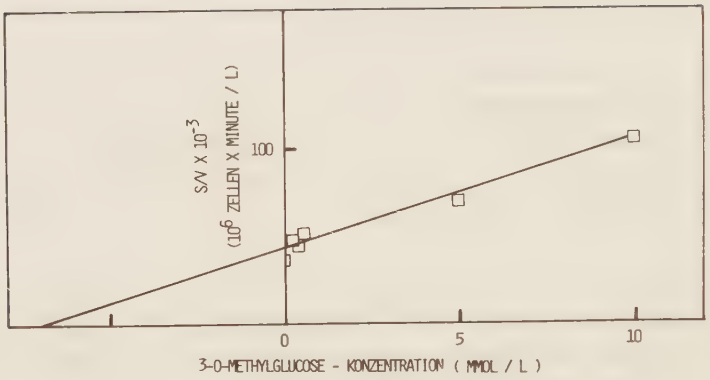


Abb. 7: Konzentrationsabhängigkeit des 3-O-Methylglucose-Transports in zero-trans-Experimenten bei 37° C
Lineare Umformung der hyperbolischen Michaelis-Menten-Sättigungsfunktion (s.o.) nach Hanes
2×10^5 Zellen/ml wurden entweder mit 3-O-[^{14}C] Methylglucose (spez. Aktivität je nach Konzentration verschieden 57,2 mCi/mMol - 0,59 mCi/mMol; Konzentration 100 µMol/l) alleine oder mit 3-O-[^{14}C]Methylglucose und unmarkierter 3-O-Methylglucose im Konzentrationsbereich von 100 µMol/l bis 10 mMol/l für 20 Sekunden inkubiert. Die Quantifizierung des Methylglucose-Transportes erfolgte wie im Methodenteil beschrieben.
Die Korrektur für die unspezifische Aufnahme erfolgte durch Bestimmung der 3-O-Methylglucose gleicher Konzentration und unter gleichen Bedingungen, aber mit L-[^{14}C]-Glucose als Tracer (100 µM; 58 mCi/mMol).

Die Aufnahme-Zeit betrug 20 Sekunden. Die aufgetragenen Werte sind Mittelwerte von drei verschiedenen Experimenten.

3.3.3 Gegentransport

Die Fähigkeit zum Gegentransport beweist die Existenz eines membrangebundenen, aber mobilen Trägers (Höfer, 1977). Das Gegentransport-Phänomen beobachtet man, wenn Zellen mit niedriger Konzentration radioaktiv markierten Substrats bis zum Äquilibrium vorinkubiert werden und ihnen dann ein Überschuß an nicht markiertem Substrat angebcten wird. Der Überschuß an unmarkiertem Substrat (K) außen verhindert weitgehend den Transport von markiertem Substrat (M) - wegen seiner niedrigen Konzentration. Es werden nur K-Moleküle übertragen. Da jedoch innen anfangs keine K-Moleküle vorhanden sind, werden zunächst ausschließlich M-Moleküle von innen nach außen transportiert. Das dauert so lange an, bis die Konzentrationen von M und K innen gleich sind (Transport-Minimum).
Wie aus Abb. 8 zu entnehmen ist, ließ sich auch an isolierten Kardiozyten ein Gegentransport nachweisen, ein Gegentransport-Minimum konnte allerdings nicht beobachtet werden. Das läßt sich durch die Interferenz der Basaltransport-Abnahme (durch die extrem langen Inkubationszeiten) mit dem Konzentrationsausgleich von M und K innen erklären.

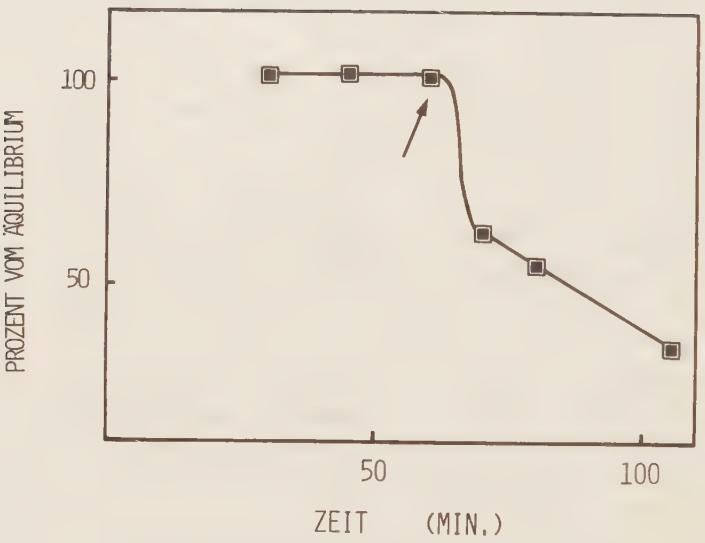


Abb. 8: Gegentransport von 3-O-[^{14}C]Methylglucose

Die Kardiozyten wurden mit 3-O-[^{14}C]Methylglucose (50 µMol/l; 57,2 mCi/mMol) bis zum Äquilibrium vorinkubiert. Dann wurde unmarkierte (↑) 3-O-Methylglucose (20 mMol/l) hinzugegeben und zu dem angegebenen Zeitpunkt der Gehalt an markierter Methylglucose gemessen. Die Zellkonzentration betrug beim Voräquilibrieren 4 x 10^5 Zellen/ml und bei der Transport-Messung 2 x 10^5 Zellen/ml.

3.3.4 Hemmbarkeit des Transportsystems

Ein weiteres Charakteristikum dieses Transportsystems war seine Hemmbarkeit durch verschiedene, jedoch chemisch ähnliche Substrate.
Wie die Hemmkinetik-Analyse zeigte (s. Abb. 9), hemmte die D-Glucose den 3-O-Methylglucose-Transport kompetitiv (Morris, 1976) mit einer Hemmkonstante K_i = 6,7 (K_i entspricht der Hemmstoffkonzentration bei halbmaximaler Hemmung).
In ähnlicher Weise wie mit D-Glucose ließ sich das Transportsystem auch von 3-O-Methylglukose hemmen (s. Tab 2). Durch Arabinose dagegen konnte man nur eine schwache Hemmung beobachten.
Die L-Glucose-Aufnahme verlief bis zu hohen Konzentrationen linear. Das ist der Beweis für eine lediglich durch Diffusion erfolgte Aufnahme und gleichzeitig auch der indirekte Beweis für die Stereospezifität des zu untersuchenden Transportsystems.

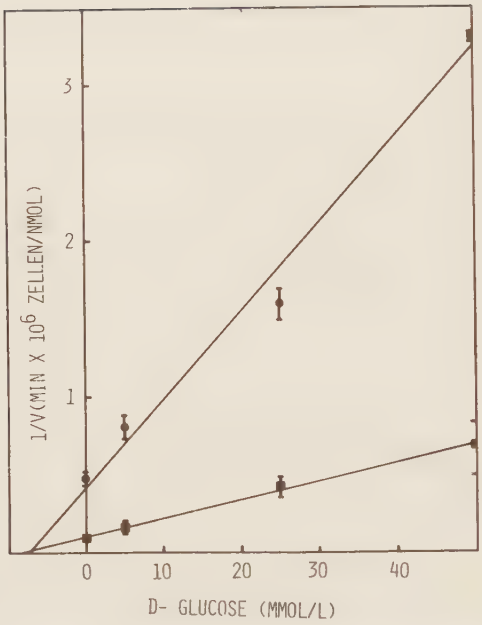


Abb. 9: Hemmbarkeit des 3-O-Methylglucose-Transports durch D-Glucose bei 25° C

Diagramm und Hemmkinetik nach Dixon (1953)

Bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen resultieren Geraden, die sich am Punkt $i = -K_i$ schneiden. Der Schnittpunkt liegt bei kompetitiver Hemmung links der Ordinate über der Abszisse. Dabei gilt:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_t}{K_i \; V_{max} \; s} \; i + \frac{K_t + s}{V_{max} \; s}$$

4×10^5 Zellen/ml wurden in Inkubationslösung 3 ohne Glucose 30 Minuten vorinkubiert. Anschließend entnahm man ein Aliquot (50 µl) der Zellsuspension und inkubierte es für 20 Sekunden in den vortemperierten Inkubationsröhrchen, die das

Substrat und den Inhibitor enthielten.

Substrat: 3-O-Methylglucose 0,5 mMol/l (●—●) und 2,5 mMol/l (■—■).
Tracer: 3-O-[^{14}C]Methylglucose 50 µMol/l; spez. Aktivität 42,5 mCi/mMol bzw. 20,5 mCi/mMol

Inhibitor: D-Glucose bei verschiedenen Endkonzentrationen (50; 25; 5 und 0 mMol/l)

Zellkonzentration bei der Inkubation: 2×10^5 Zellen/ml

Tab.: 2 Einfluß von verschiedenen Monosacchariden auf den 3-O-Methylglucose-Transport

Tracer bei allen Monosacchariden: 3-O-[^{14}C]Methylglucose (50 µMol/l; spez. Akt. 57,2 mCi/mMol bei allen Monosacchariden, außer bei 3-O-Methylglucose, wo die spez. Akt. 12,5 mCi/mMol betrug)
Der experimentelle Teil des Monosaccharid-Transports erfolgte bei 25° C, wie in Material und Methoden beschrieben. Die Transportzeit betrug 20 Sekunden.
Die Korrektur für die unspezifische Aufnahme erfolgte durch die Messung der L-Glucose-Aufnahme. Dazu wurde gesondert L-[^{14}C]-Glucose (50 µMol/l; 58 mCi/mMol) der Monosaccharid-Lösung zugegeben und ihre Aufnahme gemessen.
Die Kontroll-Rate von 480 pMol/10^6 Zellen wurde gleich 100 gesetzt.

Monosaccharide	relativer Transport	n
Kontrolle (nur Tracer)	100	7
3-O-Methylglucose (5 mM)	37	3
Glucose (5 mM)	31	3
Arabinose (5 mM)	71	3

3.3.5 Temperatur-Abhängigkeit

Nach der Theorie des Übergangszustandes von Eyring (1935) wird angenommen, daß für den Ablauf einer chemischen Reaktion eine Energiebarriere überwunden werden muß, bei der sich die beteiligten Reaktionspartner in einem aktiven Zustand befinden. Arrhenius (1889) hat eine empirische Gleichung aufgestellt, aus der die Größe dieser Aktivierungsenergie abgeschätzt werden kann:

$$\log K = - \frac{E}{2{,}303\ R} \frac{1}{T} + C$$

K = Geschwindigkeitskonstante
T = absolute Temperatur
E = Aktivierungsenergie
R = Gaskonstante
C = Integrationskonstante

Wie bei allen physiologischen Vorgängen steigt auch die Transportgeschwindigkeit mit der Temperatur exponentiell an. Der Temperaturquotient Q_{10} ist durch folgende Gleichung definiert:

$$\log Q_{10} = \frac{10}{T_2 - T_1} \log \frac{K_2}{K_1}$$

K_1; K_2 = Geschwindigkeitskonstanten bei den gewählten Temperaturen T_1 bzw. T_2

Die Bestimmung der Temperatur-Abhängigkeit des 3-O-Methylglucose-Transportsystems an den frisch isolierten Kardiozyten lieferte eine Aktivierungsenergie des Transports von 17,12 kcal/Mol (einfache Diffusion übersteigt nicht einen Wert von 4 kcal/Mol) und einen Q_{10}-Wert von 2,73 (Q_{10} bei einfacher Diffusion = 1,03 - 1,3).

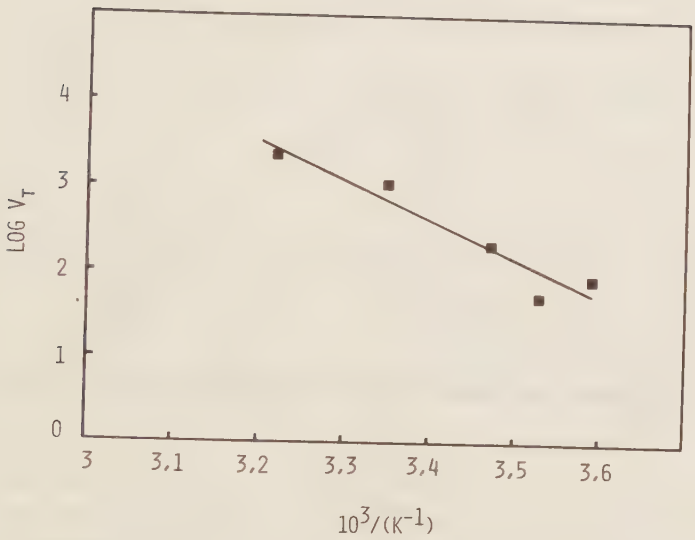


Abb. 10: Arrhenius-Diagramm der Temperatur-Abhängigkeit des 3-O-Methylglukose-Transports

Die initiale Transport-Geschwindigkeit wurde bei den u. g. Temperaturen und Transportzeiten (s. Tab. 2) und bei einer 3-O-Methylglukose- bzw. L-Glukose-Konzentration (letztere diente der Korrektur für unspezifische Aufnahme) von 20 mM zuzüglich Tracer bestimmt.
Spezifische Aktivität; Konzentration:
3-O-[^{14}C] Methylglucose : 0,28 mCi/mMol; 50 µM
L-^{14}C-Glukose: 0,29 mCi/mMol; 50 µM
Zellkonzentration: 2 x 10^5 Zellen/ml
Transport-Zeit: s. Tab. 3

Grad Celsius	Grad Kèlvin	Transportzeit
5	278,15	180 Sekunden
10	283,15	90 "
15	288,15	60 "
25	298,15	20 "
37	310,15	10 "

Tab. 3

3.4 Einfluß von Insulin auf den 3-O-Methylglucose-Transport

Eine 30 minütige Behandlung der isolierten Myozyten mit Insulin (270 nMol/l) bei 37° C stimulierte den 3-O-Methylglucose-Transport. Die Initialgeschwindigkeit erhöhte sich um durchschnittlich 60 % (s. Abb. 11). Diese Erhöhung betrifft nur den Transport, der über das spezifische 3-O-Methylglucose-Transportsystem verlief, denn die unspezifische Aufnahme ist mit und ohne Insulin identisch. Ähnliche Ergebnisse (hier nicht präsentiert) brachten auch Experimente, bei denen die Kardiozyten mit D-Glucose voräquilibriert waren und anschließend der 3-O-Methylglucose-Transport gemessen wurde. Das Transportsystem brauchte also nicht beladen zu sein, um sich durch Insulin stimulieren zu lassen und benötigt kein exogenes Substrat um stimulierbar zu sein.
Notwendig für die Stimulierbarkeit durch Insulin schien aber ein bestimmter ATP-Gehalt zu sein. Wenn Zellpräparationen einen ATP-Gehalt unter 60 nMol/10^6 Zellen aufwiesen, blieb der Insulin-Effekt aus.

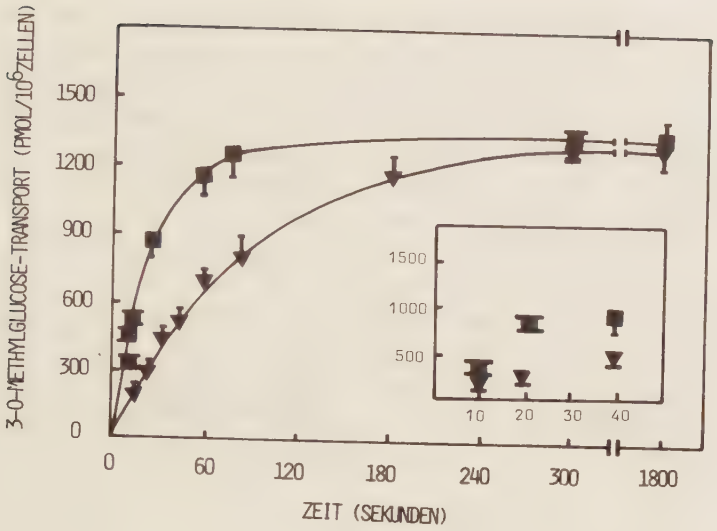


Abb. 11: Wirkung von Insulin auf den 3-O-Methylglucose-Transport bei 37° C in zero-trans-Experimenten

Insulin 270 nMol/l; Vorinkubation 30 Minuten
Volumen der Zellsuspension bei der Vorinkubation: 500 µl in Polystyrol-Röhrchen
Zellkonzentration: 4 x 10^5 Zellen/ml
Transport (s. Material und Methoden)
Die aufgetragenen Werte sind Mittelwerte ± SEM von 3 - 5 Versuchen.
Tracer: 50 µMol/l; spez. Akt. 57,2 mCi/mMol
(●—●) basal, (○—○) Insulin

Das Vermögen, Transportzeiten von 5 Sekunden exakt zu messen, ermöglichte uns die Insulin-Kopplungszeit zu erfassen. Unter Kopplungszeit ist die Zeit von der Rezeptor-Bindung bis zum Eintreten der Insulinwirkung zu verstehen. In unseren Experimenten wurde die Zeit bis zur Insulin-Bindung wegen der hohen Insulinkonzentration vernachlässigt.

Aus der graphischen Darstellung (Abb. 12) erkennt man eine absolute lag-Phase von 20 Sekunden. Der Beginn der Insulinwirkung ist ab 30 Sekunden meßbar (der 25-Sekunden-Wert ist nicht signifikant). Die maximale Insulin-Wirkung an diesem Transportsystem beginnt nach 60 Sekunden. Diese maximale Wirkung bleibt auch nach 60 Minuten Inkubation unverändert.

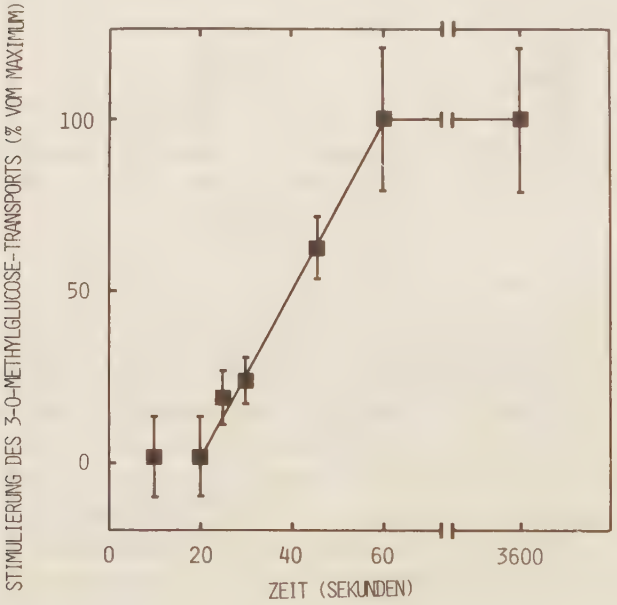


Abb. 12: Zeit-Abhängigkeit der Insulinwirkung bei 37° C (zero-trans-Experimente)
Kardiozyten (4 x 10^5/ml) wurden für die angegebenen Zeiten mit Insulin (2,7 x 10^{-7} Mol/l) inkubiert und anschließend der 3-O-Methylglucose-Transport in Gegenwart von D-Glucose (5 mMol/l) gemessen. Die Transportzeit betrug 5 Sekunden. Die aufgetragenen Werte sind Mittelwerte ± SEM bei n = 6.

Theoretisch könnte Insulin entweder die Affinitätskonstante oder die maximale Transportgeschwindigkeit des Carriers beeinflussen. Selten ist eine Wirkung auf beide diese Transportparameter beobachtet worden (Post et al., 1961). Unsere Versuche (s. Abb. 13) zeigten, daß die Affinitätskonstante durch Insulin unverändert blieb. Es wurde in zero-trans-Experimenten ein K_t-Wert von 7,7 mMol/l gemessen (K_t-Wert ohne Insulin = 6,8 mMol/l). Nach unseren Daten beruht der erhöhte Glucose-Eintritt unter der Wirkung von Insulin ausschließlich auf einem Anstieg der Maximal-Transportgeschwindigkeit von 160 nMol/10^6 Zellen x Minute auf 278 nMol/10^6 Zellen x Minute. Auch Steady-State-Experimente lieferten ähnliche Ergebnisse (hier nicht präsentiert).

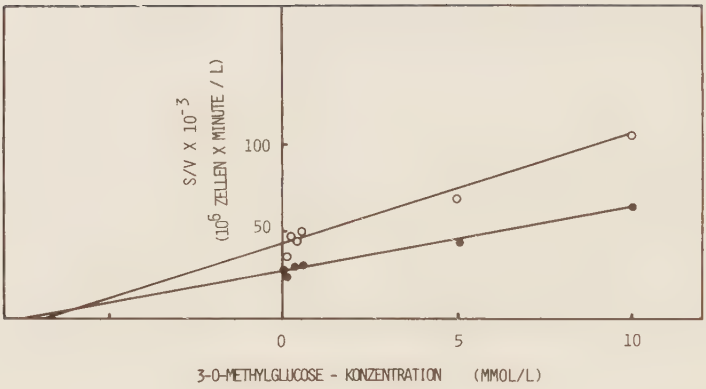


Abb. 13: Einfluß von Insulin auf die Transport-Parameter
Lineare Umformung der Michaelis-Menten-Sättigungsfunktion nach Hanes.
Der Transport wurde bei verschiedenen 3-O-Methylglucose-Konzentrationen (s. Konzentrationsabhängigkeit ohne Insulin), aber mit der selben Tracer-Konzentration (3-O-[^{14}C]Methylglucose 100 µMol/l; spez. Akt. 57,2 - 0,59 mCi/mMol je nach Konzentration) gemessen.
Transportzeit: 20 Sekunden bei 37° C
Korrektur für unspezifische Aufnahme durch L-[^{14}C]-Glucose
Die aufgetragenen Werte sind Mittelwerte ± SEM bei n = 3.
Insulinkonzentration: 2,7 x 10^{-7} Mol/l
Insulin-Vorinkubation: 30 Minuten bei 37° C
(●—●) mit Insulin; (o—o) ohne Insulin

Die Sensitivität der Kardiozyten gegenüber Insulin geht aus der Dosis-Wirkungskurve (Abb. 14) hervor. Danach wird der halbmaximale Effekt bei einer Konzentration von ca. 100 pM erreicht. Die maximale Wirkung liegt bei 1nM vor.

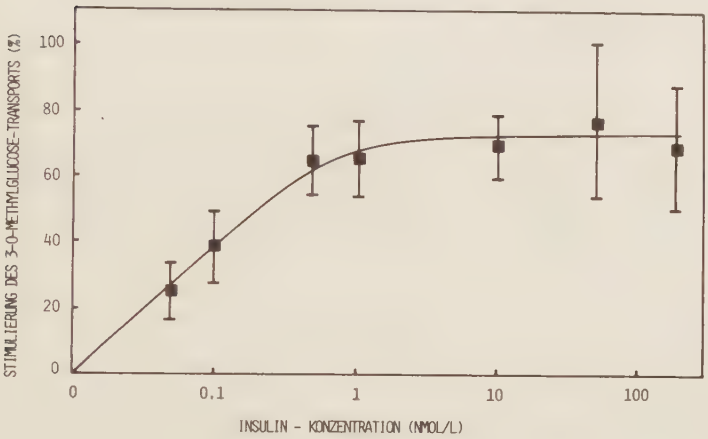


Abb. 14: Dosis-Abhängigkeit der Insulinwirkung auf den 3-O-Methylglukose-Transport bei 37° C

Insulin-Vorinkubation: 1 h
Zellkonzentration: 400.000/ml
Die Transport-Messung erfolgte wie oben bei einer Transportzeit von 20 sec.
Die Zellkonzentration bei der Transport-Messung betrug 200.000/ml.
Tracer: 3-O-[^{14}C] Methylglucose 50µM; spez. Akt. 57,2 mCi/mMol
bzw. L-[^{14}C]-Glukose 100 µM; spez. Akt. 58 mCi/mMol
Die Vorinkubation und die Transport-Messung erfolgten in Gegenwart von D-Glucose als Substrat.
Die Werte sind Mittelwerte ± SEM von 3 bis 9 verschiedenen Experimenten.

Ein Vergleich mit Daten zur Insulin-Bindung zeigt, daß die halbmaximale Insulinwirkung bei einer Besetzung von nur ca. 2 % der gesamten Insulin-Rezeptoren eintritt (Eckel et al., 1982).

3.5 Einfluß von Ca^{++}- und Mg^{++}-Ionen auf den Transport von 3-O-Methylglucose

In der Literatur gibt es widersprüchliche Hinweise, wonach sowohl extrazelluläres Ca^{++} als auch extrazelluläres Mg^{++} den 3-O-Methylglucose-Transport beeinflussen. Die Bedeutung dieser Ionen für den Methylglucose-Transport, insbesondere für die Stimulierung des Transportes durch Insulin, wurde auch an unserem Zellsystem untersucht.
Unsere Versuche zeigten, daß physiologische Ca^{++}-Konzentrationen keinen Einfluß auf den basalen Transport haben (s. Abb. 15). Auch die Stimulierung des Transports durch Insulin ließ sich durch Ca^{++} nicht beeinflussen (s. Abb. 15). Anders aber verhielten sich die nicht Ca^{++}-toleranten Zellen. Sie ließen eine von der Inkubationszeit abhängige Reduzierung der basalen Transportgeschwindigkeit erkennen, wobei der Insulin-Effekt unverändert blieb (s. Tab. 4).
Extrazelluläre, physiologische Mg^{++}-Konzentrationen bewirkten eine ca. 30 %ige Stimulierung des 3-O-Methylglucose-Transports. Dadurch betrug der Insulin-Effekt nur noch 10 - 20 % (s. Abb. 15).
In Gegenwart des Ionophors A 23187, der die Permeabilität der Cytoplasmamembran für bivalente Kationen stark erhöht (Yu et al., 1981) konnte eine unveränderte

3-O-Methylglucose-Basalaufnahme und Insulin-Stimulierung beobachtet werden (s. Tab. 5). (Die Wirkung von verschiedenen Ionophor-Konzentrationen in Gegenwart von Ca^{++} 2,5 mMol/l auf die Ca^{++}-Permeabilität der Myozytenmembran wurde hier indirekt getestet. Man konnte erst bei einer Ionophor-Konzentration von 20 µMol/l starke Kontraktionen mit anschließendem Zelltod unter dem Lichtmikroskop beobachten).
Die Insulin-Stimulierung des 3-O-Methylglucose-Transports blieb aber aus, wenn in Gegenwart des o.g. Ionophors der Chelator EDTA zugesetzt wurde (EDTA komplexiert sowohl Ca^{++} als auch Mg^{++} mit hoher Affinität). Durch die kombinierte Wirkung von Ionophor und EDTA wurden quasi diese beiden freien Kationen sowohl intra- als auch extrazellulär gebunden.
Durch Zusatz des alternativen Chelators EGTA, der die gleiche Affinität zum Ca^{++} besitzt, aber eine um den Faktor 2×10^4 (bei pH 7,4) niedrigere zu Mg^{++} als sein Vergleichspartner EDTA (Yu et al., 1980), konnte das intrazelluläre Mg^{++} ungebunden bleiben und nur das Ca^{++} durch Komplexierung vollständig entfernt werden. In diesem Fall blieb der Insulin-Effekt erhalten.

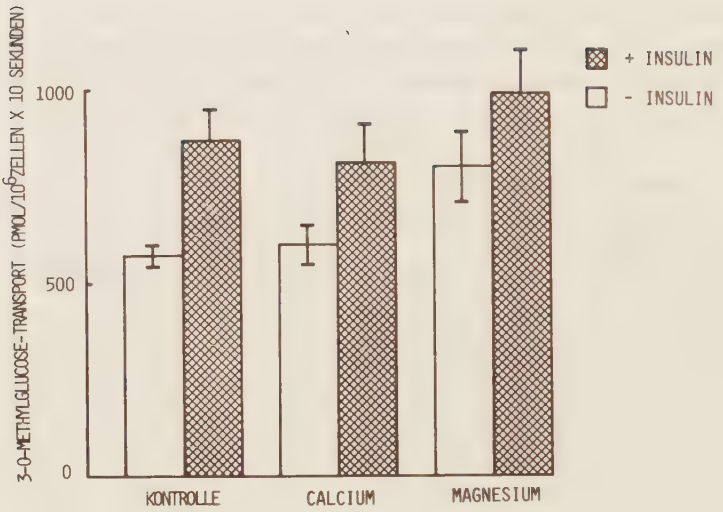


Abb. 15: Einfluß von extrazellulären Ca^{++}- und Mg^{++}-Ionen auf den 3-O-Methylglucose-Transport in Gegenwart und Abwesenheit von Insulin ($2{,}7 \times 10^{-7}$ Mol/l; Vorinkubation 30 Minuten) bei 37° C

Myozyten (4×10^5 Zellen/ml) wurden in Gegenwart oder Abwesenheit von Calcium (2,5 mMol/l) oder Magnesium (1,2 mMol/l) 15 Minuten bei 37° C vorinkubiert. Diese Vorinkubation wurde für weitere 15 Minuten in Gegenwart oder Abwesenheit von Insulin ($2{,}7 \times 10^{-7}$ Mol/l) fortgesetzt. Anschließend wurde der Transport der 3-O-Methylglucose (100 µMol/l) gemessen (s. Legende zu Abb. 6). Die Transportzeit betrug 10 Sekunden. Inkubationslösung 3 war D-Glukose (5 mMol/l) zugesetzt. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM von 6 - 9 verschiedenen Experimenten.

* signifikant unterschiedlich vom Basal-Wert mit $p < 0{,}05$

Tab. 4: Einfluß von Ca^{++} (2,5 mM) bei 37° C auf den 3-O-Methylglucose-Transport in Gegenwart und Abwesenheit von Insulin (2,7 x 10^{-7} Mol/l; Vorinkubation 30 Minuten) bei Ca^{++}-nicht-toleranten Kardiozyten

Myozyten (4 x 10^5 Zellen/ml) wurden in Gegenwart und Abwesenheit von Calcium (2,5 mMol/l) und Insulin (2,7 x 10^{-7} Mol/l) vorinkubiert.
Ca^{++}-Vorinkubation : wie angegeben
Beginn der Insulin-Vorinkubation jeweils 30 Minuten vor der Transport-Bestimmung
Nach der Vorinkubation wurde ein Aliquot (50 µl) der Zellsuspension entnommen und der Transport der 3-O-Methylglucose (50 µMol/l) bestimmt.
Transportzeit: 10 Sekunden
Tracer: 3-O-[^{14}C]Methylglucose (50 µMol/l; spez. Aktivität 57,2 mCi/mMol)
Die aufgetragenen Werte sind Mittelwerte ± SEM von 3 verschiedenen Versuchen außer bei *. Dort sind die Mittelwerte von nur 2 verschiedenen Versuchen gebildet worden.

Ink.-Zeit (Minuten)	3-O-Methylglucose-Transport ($pMol/10^6$ Zellen x 10 Sekunden)			
	Basal	Insulin	Ca^{++}	Ca^{++} + Insulin
60	330 ± 17	490 ± 22	241 ± 11	349 *
120	349 ± 21	501 ± 36	298 ± 19	391 *
180	311 ± 29	460 ± 35	466 ± 31	563 *

Tab. 5: Einfluß von Ionophor A 23187, EDTA und EGTA auf den 3-O-Methylglucose-Transport

Myozyten (4 x 10^5 Zellen/ml) wurden für 30 Minuten mit A 23187 (20 µMol/l), EDTA (1 mMol/l), EGTA (1 mMol/l) oder wie angegeben mit einer Kombination der o.g. Substanzen vorinkubiert. Anschließend wurde die Inkubation ohne und mit Insulin (2,7 x 10^{-7} Mol/l) für 15 Minuten fortgesetzt. Dann wurden Aliquote (50 µl) der Zellsuspension mit 3-O-Methylglucose (Endkonzentration 100 µMol/l; 2 x 10^5 Zellen/ml) für die Bestimmung der initialen Transportgeschwindigkeit (s. Methoden-Teil) inkubiert. Die Transportzeit betrug 10 Sekunden. Die aufgetragenen Werte sind Mittelwerte ± SEM von 3 verschiedenen Versuchen.

Behandlung	Insulin	Transport-Rate (pMol/10^6 Zellen x 10 Sekunden)	Stimulierung (%)
Kontrolle	-	331 ± 60	
	+	515 ± 54	56
EDTA	-	365 ± 15	
	+	596 ± 13	63
A 23187	-	229 ± 33 *	
	+	409 ± 69	79
A 23187 + EDTA	-	302 ± 56	
	+	323 ± 58 *	7
A 23187 + EGTA	-	264 ± 49	
	+	371 ± 79	41

* nicht signifikant unterschiedlich von der basalen Transportgeschwindigkeit mit $p < 0,05$

4. Diskussion

4.1 Zellpräparation

Die Ergebnisse zeigten, daß die durch unsere Präparationstechnik erhaltenen Ventrikel-Myozyten adulter Ratten ein geeignetes Objekt für Kurzzeit-Versuche des Stoffwechsels und des Substrattransportes sind. Eine konstante Proteinsynthese bis zu 5 Stunden nach der Isolierung, eine nur bis zu 30 %ige Abnahme der Vitalität und des ATP-Gehaltes in 3 Stunden und die Existenz eines intakten Glucose-Transportsystems, das der hormonellen Regulation unterliegt, weisen die Brauchbarkeit des Zellmodells nach.
Gegenüber extrazellulären Ca^{++}-Konzentrationen im physiologischen Bereich zeigten die Myozyten keine Kontraktur und erfüllten so, laut Literatur (Powell et al., 1976; Clark et al., 1978; Haworth et al., 1980; Kao et al., 1980), das wichtigste Kriterium der Ca^{++}-Toleranz. Interessant ist der Vergleich der verschiedenen Präparationstechniken zur Isolierung Ca^{++}-toleranter Myozyten. Sie sind alle voneinander abweichend, lediglich in einem Punkt herrscht Übereinstimmung: Das Isolationsmedium enthält Ca^{++}-Ionen im mikromolaren Konzentrationsbereich (Ausnahme: Haworth et al., 1 mMol/l) und ist demnach nicht absolut Ca^{++}-frei. Während der Isolierung sind zwar die Myozyten gegenüber physiologischen Ca^{++}-Konzentrationen extrem empfindlich, bekannt als Calcium-Paradoxon (Farmer et al., 1977; Yates et al., 1975), aber wenn die Ca^{++}-Ionen vollständig aus dem Isolationsmedium entfernt werden, beobachtet man ultrastrukturelle und physiologische Veränderungen, die zum Zelltod führen. Von großer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang der Befund, daß Taurin - eine Aminosäure, die bis zu 50 % des

freien Aminosäure-pools des Säugetierherzens ausmacht (Newman et al., 1977) - während und nach der Ca^{++}-freien Perfusion in ihrer Konzentration stark abnimmt und daß eine Taurin-Behandlung in Gegenwart von Calcium-Ionen eine Normalisierung der Ca^{++}-Bindung an das Sarkolemma bewirkt (Kramer, 1981).
Die Ca^{++}-Konzentration, die während der Isolierung für die physiologische und morphologische Integrität der Myozyten notwendig ist, scheint nach Meinung von Dow et al. (1981) artspezifisch zu sein und darf für die Ratten 250 µM nicht überschreiten (Muir, 1967). Die Glykokalyx, die durch unsere Präparation erhalten blieb (s. Abb. 1), benötigt für ihre Funktion ebenfalls Ca^{++}-Ionen im Bereich zwischen 50 und 250 µM (Langer et al., 1976; Crevey et al., 1978).
In Übereinstimmung mit der Literatur (Dow et al., 1981) zeigten die Myozyten eine Korrelation zwischen Ca^{++}-Toleranz und dem Vermögen, den ATP-Gehalt über mehrere Stunden konstant zu halten. Eine Erklärung dafür könnte in dem Fehlen der elektrischen und chemischen Stimuli für die Kontraktion liegen. Dadurch bleiben vermutlich die energiereichen Reserven unbeansprucht und demnach hoch (Ca^{++}-intolerante Zellen haben nach Burns (1975) niedrigere ATP-Level) und konstant.

4.2 3-O-Methylglucose-Transportsystem

Als "Stellglied" des Stoffwechsels kann der Membrantransport durch Rückkopplung vom Stoffwechsel her reguliert werden. Dadurch ist die Transport-Messung von metabolisierbaren Substraten wie D-Glucose fast nur mit Hilfe von nicht-metabolisierbaren Analoga zu bewerkstelligen.
Der Glucose-Eintritt in die Ventrikel-Myozyten wurde hier erstmals anhand des nicht-metabolisierbaren D-Glucose-

Analogons 3-O-Methylglucose ausführlich behandelt. Die kinetische Analyse der Daten zeigte, daß der 3-O-Methylglucose-Eintritt in die Myozyten durch ein trägervermitteltes Transportsystem erfolgt. Schon bei früheren Herzperfusionsarbeiten (Kones, 1971) ist berichtet worden, daß Glucose die Herzzellmembran schneller passiert, als man auf Grund ihrer Molekülstruktur und Lipidlöslichkeit erwartet hatte und sprach von erleichterter Diffusion.

An isolierten, aber nicht Ca^{++}-toleranten Myozyten (Vahouny et al., 1979; Grosso et al., 1977) ist ebenfalls die Existenz dieses Transportsystems nachgewiesen worden.

Bei Ca^{++}-toleranten Zellen ist erst kürzlich von Haworth et al. (1982) der Transport von 2-Desoxy-D-Glucose gemessen worden. Dieses Monosaccharid wird jedoch nach seinem Eintritt in die Zelle phosphoryliert. Wieringa et al. (1981) berichten über eine intrazelluläre Akkumulation von 2-Desoxy-D-Glucose nach einer Dephosphorylierung. Dieser Befund erschwert die Interpretation der Transport-Kinetik von 2-Desoxy-D-Glucose im Gegensatz zur 3-O-Methylglucose-Transportkinetik.

Die Fähigkeit zum Gegentransport beweist in Übereinstimmung mit Grosso et al. (1977) die Mobilität des zu untersuchenden Transportsystems. In allen Muskelgeweben scheint übereinstimmend die Existenz eines mobilen Glucose-Carriers als sicher, denn das Phänomen des Gegentransports von Glucose ist am M. gastronemius, M. soleus, Diaphragma und Herz gezeigt worden.

Die im Rahmen dieser Arbeit erstmals an isolierten Kardiozyten gemessene Aktivierungsenergie und der Q_{10}-Wert des Transports ordnen das 3-O-Methylglucose-Transportsystem mit einer Aktivierungsenergie von 17,12 kcal/Mol und einem Q_{10}-Wert von 2,73 eindeutig den Carrier-katalysierten Transportsystemen zu (die Aktivierungsenergie

für die physikalische Diffusion übersteigt nie 4 kcal/Mol und der Q_{10}-Wert ist immer ≤ 1,3).

Die Hemmbarkeit durch verschiedene Monosaccharide, insbesondere die hier gezeigte kompetitive Hemmung durch D-Glucose, besagt in Übereinstimmung mit Morgan et al. (1964), daß der untersuchte Carrier von mehreren Monosacchariden gemeinsam benutzt wird, aber mit der Rangordnung: Glucose > 3-O-Methylglucose > Arabinose. Die L-Glucose-Aufnahme zeigt auch bei hohen Konzentrationen keine Sättigung, was indirekt die Stereospezifität des Carriers beweist.

Mit zunehmender Substratkonzentration ließ sich der 3-O-Methylglucose-Carrier mit einer Halbsättigungs-Konstante (K_t) von 6,8 mMol/l bei einer maximalen Transportgeschwindigkeit (V_{max}) von 160 nMol/10^6 Zellen x Minute sättigen. Der K_t-Wert von 6,8 entspricht genau dem K_t-Wert für 3-O-Methylglucose am perfundierten Herzen (Morgan, H.E., 1964) und liegt in der gleichen Größenordnung wie die gemessenen K_t-Werte an nicht Ca^{++}-toleranten Myozyten. Letztere haben jedoch eine viel geringere maximale Transport-Geschwindigkeit. Sie betrug bei Grosso (1977) umgerechnet ca. 20 nMol/10^6 Zellen x Minute. Die maximale Transportgeschwindigkeit stellt ein Maß der Transport-Kapazität dar und ist abhängig von: 1) der Zahl der vorhandenen Carrier-Moleküle und 2) der Umlaufrate des Carriers durch die Membran (Höfer, 1977) Da bei Ca^{++}-nicht-toleranten Zellen Membranschädigungen beobachtet wurden (Yates et al., 1975) könnte aufgrund dieser Schädigungen die Anzahl der vorhandenen Glucose-Carrier reduziert worden sein.

1.3 Einfluß von Insulin, Ca^{++} und Mg^{++} auf den 3-O-Methylglucose-Transport

Seit der Entdeckung des Peptidhormons Insulin vor 60 Jahren (Banting et al., 1922) und der Strukturaufklärung durch die Pionierarbeiten von Sanger (1959) und Blundell et al. (1972) ist die Erforschung seines Wirkungsmechanismus Gegenstand kontroverser Meinungen. Eines gilt aber als gesichert: Die Kurzzeit- und Langzeit-Effekte beginnen nach der Interaktion des Insulins mit seinen spezifischen Rezeptoren (Jakobs et al., 1979; Czech, 1980). Langzeit-Effekte sind z. B. Veränderungen des Protein- und Glykogen-Stoffwechsels, während als Kurzzeit-Effekte z. B. Veränderungen von Transportvorgängen und -aktivitäten von in der regulatorischen Rangordnung früh eingeschalteten Enzymen gelten.
Der erste Ort der Insulin-Wirkung sind die Rezeptoren in den Cytoplasmamembranen von Fett- und Muskelgewebe (Randle et al., 1962; Crofford et al., 1965; Czech, 1980) und die zuerst eintretende Kurzzeit-Wirkung ist die Wirkung auf den Glucose-Transport durch die Cytoplasmamembranen der oben genannten Gewebe (Cushman et al., 1980; Suzuki et al., 1980). Dort erhöht Insulin am M. sartorius (Ratte) nach Berichten von Narahara et al. (1963) die maximale Transportgeschwindigkeit (V_{max}) um den Faktor 10, ohne jeglichen Einfluß auf die Halbsättigungskonstante (K_t). Ähnliche Berichte stammen von Studien an Adipozyten (Czech et al., 1974; Wardzala et al., 1978; Whitesell et al., 1979).
Ganz andere Beobachtungen aber machten Illiano et al. (1971) und Crofford (1975) am gleichen Objekt. Sie konnten eine Insulin-induzierte Erniedrigung der Halbsättigungskonstante ohne Einfluß auf die maximale Transportgeschwindigkeit feststellen. Am perfundierten Her-

zen gibt es Berichte mit dichotomen Insulin-Wirkungen: Bei hoher Insulin-Konzentration wurden K_t und V_{max} erhöht (Fisher et al., 1970; Post et al., 1961) und bei niedrigen Insulin-Konzentrationen wurde die V_{max} erniedrigt (Fisher et al., 1970).
An isolierten Ca^{++}-toleranten Myozyten adulter Ratten wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal der Einfluß von Insulin auf die Transport-Parameter mittels Initialtransport-Messung getestet.
Die Ergebnisse zeigten eine im Vergleich zu Perfusionsarbeiten am Herzen hohe Insulin-Sensitivität, die im physiologischen Bereich liegt und eine durch Insulin bewirkte Erhöhung der maximalen Transportgeschwindigkeit von 160 nMol/10^6 Zellen x Minute auf 270 nMol/10^6 Zellen x Minute bei unveränderter Halbsättigungskonstante.
Die V_{max}-Erhöhung bedeutet entweder eine Erhöhung der Umlaufrate des Transportsystems oder eine Zunahme der Zahl der aktiven Carrier-Moleküle. Für letzteres spricht die Zunahme der Cytochalasin B-Bindungsstellen nach Insulin-Behandlung an Adipozyten-Plasmamembranen (Wardzala et al., 1978). Diese Zunahme der Carrier-Moleküle sollte nach Meinung von Suzuki et al. (1980) und Wardzala et al. (1981) zum Teil durch eine Translokation von intrazellulären Transport-Einheiten in Form einer Exozytose erfolgen.
Diese Exozytose müßte aber sehr schnell ablaufen, denn die Bestimmung der Insulin-Kopplungszeit lieferte uns eine lag-Phase von 20 Sekunden und den ersten meßbaren Insulin-Wirkungseintritt nach 30 Sekunden bei 37° C.
Diese Daten stimmen in der Größenordnung mit den Ergebnissen an Adipozyten überein und erfordern eine rasche Signalübertragung zwischen Insulin-Rezeptor und Transportsystem.
Von großer Bedeutung ist diesbezüglich die Beobachtung (Czech et al., 1974), daß die Insulin-Aktivierung

des Hexose-Transports mit der Oxidation von Membran-Sulfhydryl-Gruppen zur Disulfid-Form gekoppelt ist. Eine weiterführende Erklärung ist aber bis heute ausgeblieben.
Auch Phosphorylierungsreaktionen an einigen zellulären Proteinen (Denton, 1981) bzw. am Insulin-Rezeptor selbst (van Obberghen, et al., 1982) sind beobachtet worden und könnten von großer Bedeutung sein. Eine andere Hypothese, die intensive kontroverse Diskussionen auslöste, ist die, daß Ca^{++}-Ionen intrazellulär die Rolle eines "second messengers" für die Insulin-Wirkung spielen sollen. Sie basiert auf der Beobachtung, daß Insulin eine Vergrößerung der intrazellulären freien Ca^{++}-pools bewirkt (Bihler, 1972; Clausen, 1977; Fraser et al., 1975).
Unsere Ergebnisse zeigten, daß weder das intrazelluläre noch das extrazelluläre Calcium irgendeine Rolle für den Glucose-Transport und die Insulin-Wirkung spielen. Diese Beobachtung stimmt mit Haworth's (1982) Ergebnissen völlig überein.
Eine wichtige Rolle scheint hingegen das Magnesium-Ion zu spielen. Es zeigte sich, nach unseren Ergebnissen, als ein Stimulans des 3-O-Methylglucose-Transports, wenn es extrazellulär in physiologischer Konzentration vorliegt. Insulin in Gegenwart von Mg^{++}-Ionen stimulierte zusätzlich den Transport um ca. 10 %.
Mit Hilfe des kombinierten Einsatzes von EGTA und EDTA, die unterschiedliche Affinitäten zu Ca^{++}- und Mg^{++}-Ionen besitzen und des Ionophors A 23187, der die Permeabilität der Membranen für bivalente Kationen stark erhöht, konnte hier eine Bedeutung des intrazellulären Mg^{++}-Ions für die Insulin-Wirkung auf den Transport gefunden werden. Es zeigte sich als notwendig für die Stimulierung des Methylglucose-Transports durch Insulin.
Neue Befunde von Yu et al. (1981), bei denen die

Stimulierung des Glucose-Transports am M. soleus (Ratte) durch Kälte-Behandlung bei 0^{o} C durch eine Zunahme der cytoplasmatischen Mg^{++}-Ionen-Konzentration erklärt wird, unterstützen die Bedeutung unserer Ergebnisse.
Nach den vorliegenden Daten liegen folgende Vermutungen nahe: 1) das intrazelluläre Mg^{++}-Ion könnte die Rolle eines "second messengers" spielen oder 2) als Cofaktor im Rahmen von Phosphorylierungsreaktionen unentbehrlich für den Signal-Transfer sein.

5. Zusammenfassung

An Ca^{++}-toleranten Myozyten adulter Ratten wurde das 3-O-Methylglucose-Transportsystem durch zero-trans-Experimente charakterisiert, die Modulation des Transportsystems durch Insulin untersucht und der Insulin-Wirkungsmechanismus unter besonderer Berücksichtigung von Ca^{++} und Mg^{++} analysiert.
Die Charakterisierung der Zellpräparation zeigte, daß die isolierten Myozyten eine intakte Ultrastruktur, einen über mehrere Stunden konstant bleibenden ATP-Gehalt und physiologische Stoffwechselaktivitäten besitzen.
Untersuchungen des 3-O-Methylglucose-Transportes zeigten einen initialen Influx bis zu 20 Sekunden bzw. 40 Sekunden bei 37° C bzw. 25° C. Das Transportsystem erfüllte alle Kriterien eines Träger-vermittelten Transportes (facilitated diffusion): eine Sättigungskinetik mit einer Affinitätskonstante (K_t) von 6,8 mMol/l und eine maximale Transportgeschwindigkeit (V_{max}) von 160 nMol/10^6 Zellen x Minute; eine kompetitive Hemmung durch D-Glucose mit einer Hemmkonstante (K_i) von 6,7 mMol/l; eine Temperaturabhängigkeit des Transportes bei einer Aktivierungsenergie von 17,2 kcal/10^6 Zellen x Minute und einen Q_{10}-Wert von 2,7; die Fähigkeit zum Gegentransport.
Insulin stimulierte die initiale Transportgeschwindigkeit um ca. 60 %. Diese Stimulierung ist auf eine Veränderung der maximalen Transportgeschwindigkeit von 160 nMol/10^6 Zellen x Minute auf 278 nMol/10^6 Zellen x Minute zurückzuführen. Dafür ist es nicht erforderlich, daß der Carrier beladen ist. Erforderlich hingegen ist die Existenz eines intrazellulären ATP-Gehaltes von 60 nMol/10^6 Zellen.

In Gegenwart von extrazellulären Ca^{++}-Ionen (2,5 mMol/l) bleiben der Basaltransport und die Insulin-Stimulierung unbeeinflußt. Extrazelluläre Mg^{++}-Ionen (1,2 mMol/l) dagegen erhöhen den Basaltransport um ca. 30 %, und dabei verringert sich der Insulin-Effekt auf ca. 10 %.
Ferner wurde durch den kombinierten Einsatz von Ionophor A 23187, EDTA und EGTA gezeigt, daß intrazelluläre Mg^{++}-Ionen für den Transfer des Insulin-Signals notwendig sind.
Im Hinblick auf den Insulin-Wirkungsmechanismus wurde die Hypothese aufgestellt, daß die Insulinwirkung an das Vorhandensein von Mg^{++}-Ionen gebunden ist, wobei Mg^{++} als Cofaktor im Rahmen von Phosphorylierungs-Reaktionen für den Signaltransfer funktionieren könnte.

6. Literatur

Anderson, F.F. & Craver, B.N. (1948) J. Pharm. exp. Ther. 93, 135

Arrheinius, S. (1889) Z. Physik Chem. 4, 226-248

Banting, F.G. & Best, C.H. (1922) J. Lab. Clin. Med. 7, 251-266

Berry, M.N., Friend, D.S. & Scheuer, J. (1970) Circ. Res. 26, 679-687

Bihler, J. (1972) in The Role of Membranes in Metabolic Regulation, Eds. New York, Academic Press, 411-422

Bihler, J. (1980) Adv. Myocardiol. 2, 3-15

Blundell, T., Dodson, G., Hodgkin, D. & Mercola, D. (1972) Adv. Prot. Chem. 26, 280-402

Bodo, R. & Marn, H.P. (1927) J. Physiol. Lond. 63, 242

Christensen, H.N. (1975) in Biological Transport, 2nd ed., Benjamin, Reading, MA

Chenoreth, M.B. & Coelle, E.S. (1946) J. Lab. Clin. Med. 31, 200

Clark, M.G., Gannon, B.J., Bodkin, N., Patten, G.S. & Berry, M.N. (1978) J. Mol. Cell Cardiol. 10, 1101-1121

Clausen, T. (1977) FEBS Symposium No 42, Springer Verlag

Cornish-Bowden, A. (1976) Principles of Enzyme Kinetics, Butterworths, London

Crevey, B.J., Langer, G.A. & Frank, J.S. (1978) J. Mol. Cardiol. 10, 1081-1100

Crofford, O.B. & Renold, A.E. (1965) J. Biol. Chem. 179, 985-986

Crofford, O.B. (1975) J. Biol. Chem. 250, 7089-7092

Cushman, S.W. & Wardzala, L.J. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4758-4762

Czech, M.P.,Lawrence, J.C. & Lynn, W.S. (1974) J. Biol. Chem. 249, 5421-5427

Czech, M.P. (1980) Diabetes 29, 399-409

Denton, R.M., Brownsey, R.W. & Welsharn, G.J. (1981) Diabetologia 21, 347-362

Dixon, M. (1953) Biochem. J. 55,170-171

Dow, J.W., Harding, N.G.L. & Powell, T. (1981) Cardiovask. Res. 15, 483-514

Eckel, J. & Reinauer, H. (1980) Biochim. Biophys. Acta 629, 510-521

Eckel, J. & Reinauer, H. (1982) Biochem. J. 206, 655-662

Eckel, J., Pandalis, G. & Reinauer, H. (1982) Biochem. J. zur Publikation eingereicht

Eyring, H. (1935) J. Chem. Phys. 3, 107-115

Farmer, B.B., Harris, R.A., Jolly, W.W., Hathaway, D.R., Katzberg, A., Watanabe, A.M., Whitlow, A.L. & Besch, J.R. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 179, 545-558

Fischer, U. (1971) Acta biol. med. germ. 26, 87-99

Fisher, R.B. & Gilbert, J.C. (1970) J. Physiol. London 210, 297-304

Forrester, T. & William, A. (1977) J. Physiol. 268, 371-390

Frank, J.S., Langer, G.A., Nudd, L.N. & Seraydarian, K. (1976) Fed. Proc. 35, 535

Fraser, T. & Russell, M.D. (1975) Proc. Roy. Soc. Med. 68, 785-791

Grosso, D.S., Frangakis, C.J. & Carlson, E.C. (1977) Preparat. Biochem. 7 (5), 383-401

Hanes, G.S. (1932) Biochem. J. 26, 1406-1421

Haworth. R.A., Hunter, D.R. & Berkoff, H.A. (1980) J. Mol. Cell Cardiol. 12, 715-723

Hume, J.R. & Giles, W. (1981) J. Gen. Physiol. (in Druck)

Höfer, M. (1977) Transport durch biologische Membranen, Verlag Chemie, Weinheim, New York

Illiano, G. & Cuatrecasas, P. (1971) J. Biol. Chem. 246, 2472-2479

Jacobs, S. Hazum, E., Schechter, Y. & Cuatrecasas, P. (1979) Proc. Natl. Akad. Sci., USA 76, 4918-4921

Kao, R.L., Christman, E.W., Luh, S.L., Krauhs, J.M., Tyers, G.F.O. & Williams, E.H. (1980) Arch. Biochem. Biophys. 203, 587-599

Klingenberg, M. & Pfaff, E. (1967) Methods Enzymol. 10, 680-684

Kones, R.J. (1971) J. Mol. Cell Cardiol. 3, 179-192

Kramer, J.H., Chovan, J.P. & Schaffer, S.W. (1981) Am. J. Physiol. 240, 238-246

Langer, G.A., Frank, J.S., Nudd, L.M. & Seraydarian, K. (1976) Science 193, 1013-1015

Levine, R. & Goldstein, M. (1955) Rec. Progr. Horm. Res. 11, 343-380

Lin, S. & Spudich, J.A. (1974) J. Biol. Chem. 249, 5778-5783

Mc Nutt, N.S., Weinstein, R.S. (1970) J. Cell Biol. 47, 666-688

Mehdi, T. & Sachs, F. (1978) Biophys. J. 21, 165 a

Montini, J., Bagby, G.J., Burns, A.H. & Spitzer, J.J. (1981) Am. J. Physiol. 240, H659-H663

Morgan, H.E., Henderson, M.J., Regen, D.M. & Park, C.R. (1961) J. Biol. Chem. 236,253-261

Morgan, H.E., Regen, D.M. & Park, C.R. (1964) J. Bicl. Chem., 239, 369-373

Morris, J.G. (1976) Physikal. Chemie für Biologen, Verlag Chemie, Weinheim, New York

Muir, A.R. (1957) J. Biophys. Biochem. Cytol. 3, 193-202

Narahara, H.T. & Ozand, P. (1963) J. Biol. Chem. 238, 40-49

Newman, W.H., Frangakis, C.J., Grosso, D.S. & Bressler, R. (1977) Physiol. Chem. Phys. 9, 259-263

Newsholme, E.A. & Randle, P.J. (1964) Biochem. J., 93, 641

Oliver, M.F. (1972) Ibid. 45, 491

Opie, L.H., Shipp, J.C., Evans, J.R. & Leboeuf, B. (1962) Am. J. Physiol. 203, 839

Opie, L.H. (1970) J. Molec. Cell Cardiol. 1, 107

Opie, L.H., Mansford, K.R.L. & Owen, P. (1971) Biochem. J. 124, 475-490

Opie, L.H., Tansey, M.J. & Kennely, B.M. (1979) S. Afr. med. J. 56, 207

Post, R.L., Morgan, H.E. & Park, C.R. (1961) J. Biol. Chem. 236, 269-272

Powell, T. & Twist, V.W. (1981) J. Mol. Cell Cardiol. 13 (in Druck)

Rajs, J., Sundberg, M., Sundby, G.B., Danell, N., Torlling, G., Biberfeld, P. & Jakobson, S.W. (1978) Experimental Cell Research 115, 183-189

Randle, P.J. & Morgan, H.E. (1962) Vit Horm. (NY) 20, 199-249

Regen, D.M. & Morgan, H.E. (1964) Biochim. Biophys. Acta 79, 151-166

Sanger, F. (1959) Science 129, 1340-1344

Scheuer, J. & Berry, M.N. (1967) Am. J. Physiol. 213, 1143

Stein, W.D. (1981) in Membrane Transport (Ponting, de Pont, Eds.), pp. 123-157, Elsevier-North-Holland-Biomedical-Press

Suzuki, K. & Kono, T. (1980) Biochemistry 77, 2542-2545

Tsokos, J. & Bloom, S. (1976) Biochim. Biophys. Acta 423, 42-51

Vahouny, G.V., Wei, R.W., Tamboli, A. & Albert, E.N. (1979) J. Mol. Cell. Cardiol. 11, 339-352

Vahouny, G.V., Wei, R., Starkweather, R. & Davis, I. (1970) Science 167, 1616-1618

van Breemen, V.L. (1953) Anat. Rec. 117, 49-63

van Obberghen, E & Kowalski, A. (1982) FEBS Letters 143, 179-182

Wardzala, L.J., Cushman, S.W. & Salans, L.B. (1978) J. Biol. Chem. 253, 8002-8005

Wardzala, L.J. & Jeanrenaud B. (1981) J. Biol. Chem. 256,7090-7093

Whitesell, R.R., Gliemann, J. (1979) J. Biol. Chem. 254, 5276-5283

Wieringa, T., van Putten, J.P.M. & Krans, H.M.J. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 103, 841-847

Yates, J.C. & Dhalla, N.S. (1975) J. Mol. Cell. Cardiol. 7, 91-103

Yokoyama, H.O., Jennings, R.B. & Wartman, W.B. (1961) Exp. Cell. Res. 23, 29-44

Yu, K.T., Keo, L. & Gould, M.K. (1980) Cell Calcium 1, 337-347

Yu, K.T. & Gould, M.K. (1981) Diabetologia 21, 482-488

Zak, R. (1974) Cirk. Res. 34/35 (suppl. II) 17-26

Zimmerman, A.N.E. & Hülsmann, W.C. (1966) Nature, London 211, 646-649